UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA” DE ICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOINSECTICIDA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Agave murpheyi f. variegata* “agave” Y *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta” FRENTE A *Planococcus citri* “chanchito blanco”; ICA, OCTUBRE 2017 – MARZO 2018.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

BACH. BENDEZÚ RAMOS, Alex de Jesús

BACH. GARCIA SORIA, Yovana Stefany

ICA – PERÚ

2019

A Dios, por permitirnos llegar a este momento tan importante de nuestras vidas. A nuestros padres, por su motivación constante, sus valores, consejos y sabiduría que nos han transmitido durante nuestra vida y formación profesional. A nuestros hermanos por el apoyo incondicional y el respaldo que siempre nos brindan.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que han formado parte de nuestras vidas y han visto desarrollarnos como profesionales, a las que nos gustaría agradecer por su amistad, consejos y apoyo incondicional.

A nuestra familia, en especial a nuestros padres; Carmen Ramos, Fany Soria, Yovani García y Galo Bendezú que nos han apoyado en los momentos más difícil de nuestras vidas y han sido el pilar de nuestra formación.

A nuestros asesores; Juan José Guillermo Albitres, Haydee Chávez Orellana, Hanna Cáceres Yparraguirre y Antoine Geneste; por su apoyo, dedicación, motivación, criterios y enseñanzas; que han sido de suma importancia para el desarrollo y culminación de este proyecto. Agradecer a cada uno de ellos por su visión crítica y acertada que nos han ayudado a formarnos como personas e investigadores.

A nuestros maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas por impartirnos sus conocimientos, experiencias y habernos brindado todo su apoyo a lo largo de nuestra formación profesional.

A la Reserva Nacional Pampa Galeras Bárbara d'Achille por incentivar a realizar proyectos de investigación en zonas reservadas y a todo su equipo que nos apoyaron en la toma de muestra.

Al Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica CITEagroindustrial, por permitirnos realizar nuestros ensayos en sus laboratorios y apoyarnos con las determinaciones y análisis que fueron necesarios.

Al laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad San Luis Gonzaga de Ica por permitirnos realizar la extracción y determinación de compuestos secundarios.

ÍNDICE

	Pág.
Carátula……	i
Dedicatoria……..	ii
Agradecimientos……...	iii
Resumen……	vi
Abstract……	vii
I. Introducción……..	1
II. Antecedentes……	5
III. Materiales y Método…….	8
3.1. Materiales……..	8
3.1.1. Material biológico……...	8
3.2. Método…….	8
3.2.1. Identificación de las plantas colectadas…….	8
3.2.2. Elaboración de los extractos etanólicos……..	8
3.2.3. Crianza de *Planococcus citri* “chanchito blanco” en laboratorio……	14
3.2.4. Efectividad bioinsecticida de los extractos……..	16
IV. Resultados……	20
4.1. Efecto bioinsecticida de *Azorella diapensioides* “yareta”……	20
4.2. Efecto bioinsecticida de *Agave murpheyi* forma variegata “agave”……..	23
4.3. Diferencia del efecto bioinsecticida de *Agave murpheyi* “agave” y *Azorella diapensioides* “yareta”……	25
4.4. Screening fitoquímico de *Azorella diapensioides …..*	27
4.5. Screening fitoquímico de *Agave murpheyi……...*	28
V. Discusión…….....	29
VI. Conclusiones……	33
VII. Recomendaciones……..	34
VIII. Referencias Bibliográficas…….	35
IX. Anexos……..	41

RESUMEN

Planococcus citri “chanchito blanco” es una plaga importante de cítricos, vid y sus malezas asociadas en todo el mundo. El control de este fitófago se basa en un control integrado, donde los extractos vegetales constituyen una real alternativa. Por tal motivo, la investigación experimental de tipo aplicada tuvo como objetivo evaluar el efecto bioinsecticida de los extractos etanólicos de A*gave murpheyi* “agave” y *Azorella diapensioides* “yareta” frente a la mortandad de *Planococcus citri* “chanchito blanco”.

El estudio se desarrolló en los laboratorios del CITEagroindustrial y la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, donde se obtuvieron los extractos etanólicos de las plantas y se crió la cepa de *Planococcus citri* en zapallos y brotes de papas. Para los bioensayos, cada repetición consistió en 25 individuos dispuestos en tapers de un litro que contenían un tubérculo de papa. Las concentraciones evaluadas fueron de 10, 25, 50 y 75% del extracto de A*gave murpheyi* “agave” y 10, 25, 50 y 60% del extracto de *Azorella diapensioides* “yareta”. Los tratamientos positivo y negativo constaron en un producto químico y agua – tween respectivamente. Todos los tratamientos fueron aplicados por aspersión mediante atomizadores manuales. Luego de la aplicación de los extractos se evaluó la mortandad con ayuda de un estereoscopio a las 5 y 24 horas, contabilizando los individuos de *Planococcus citri* muertos por el efecto de los extractos.

Los resultados obtenidos fueron de gran importancia con un 68% de mortandad en la concentración al 50% del extracto de *Azorella diapensioides* “yareta” y 71 % de mortandad para la concentración al 75% del extracto de A*gave murpheyi* “agave”. Los datos fueron ajustados con la fórmula de Abbott corregida y procesados con el análisis de varianza (ANOVA). Se obtuvo diferencia significativa de los extractos de yareta y agave frente a sus diferentes concentraciones y frente al control negativo.

PALABRAS CLAVES: Biocidas, metabolitos secundarios, piojo harinoso. citrus mealybug.

ABSTRACT

Planococcus citri "citrus mealybug" is an important pest for citrus, vine and their associated weeds around the world. The control of this phytophagous is based on an integrated control, where plant extracts are a real alternative. Therefore, the objective of experimental research of the applied type was to evaluate the bioinsecticidal effect of the ethanolic extracts of *Agave murpheyi* "agave" and *Azorella diapensioides* "yareta" on the mortality of *Planococcus citri* "citrus mealybug".

The study was carried out in the laboratories of CITEagroindustrial and Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, where ethanolic plant extracts were obtained and the *Planococcus citri* strain was grown in pumpkins and potato buds. For the bioassays, each replicate consisted in 25 individuals placed in one-liter containers containing a potato tuber. The concentrations evaluated were 10, 25, 50 and 75% of *Agave murpheyi* "agave" extract and 10, 25, 50 and 60% of *Azorella diapensioides* "yareta" extract. Positive and negative controls consisted in chemical and a water-tween solution respectively. All treatments were applied by spray with manual sprayers. Mortality was evaluated at 5 and 24 hours after application, by counting the individuals of dead *Planococcus citri*, with the help of a stereoscope.

The results obtained were of great importance with 68% and 71% mortality in the concentration of 50% of the extract of *Azorella diapensioides* "yareta" and 75% concentration of the extract of *Agave murpheyi* "agave" respectively. The data were adjusted with the corrected Abbott formula and processed with the analysis of variance (ANOVA). Significant difference was obtained from the extracts of yareta and agave against their different concentrations and against the negative control.

Keywords: Biocides, secondary metabolites, citrus mealybug

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad una gran cantidad de insectos son plagas de los diferentes cultivos más importantes en el Perú, estas plagas pueden ocasionar defoliación, daños a los frutos, flores, semillas, brotes, raíces y tallos de todos los cultivos susceptibles a ellos. Una de las plagas más importantes es *Planococcus citri*, que ataca a una gran variedad de cultivos, siendo las vides uno de los cultivos más susceptibles a esta plaga.

Planococcus citri (Risso) es una plaga conocida en el Perú y en el mundo con diversos nombres vulgares como chanchito blanco, cochinilla harinosa, cochinilla algodonosa, citrus mealybug, cotonet, entre otros; esto referido a su aspecto harinoso, por las secreciones de su cuerpo y por la melaza que excretan. Esta especie polífaga ha sido descrita sobre más de 180 especies de plantas y se alimenta de especies vegetales tanto árboles como arbustos [1]. La hembra puede producir alrededor de 300 a 600 huevos que los pone de forma agrupada en estructuras algodonosas llamadas ovisacos. Las ninfas migrantes emergen de los ovisacos al cabo de 2 a 10 días [2]. Las hembras de *P. citri* poseen tres estadios ninfales. Los machos, poseen el primer y segundo estadio ninfal similar a la hembra, aunque de menor tamaño, luego se desarrolla un prepupoide y pupoide que se observa como un capullo algodonoso alargado del cual emergen en aproximadamente 11 días, este será un adulto alado con dos filamentos en la parte trasera y de aspecto frágil [3].

Los efectos producidos por la ninfas y hembras adultas de *P. citri* son los daños ocasionados por la succión de savia de las plantas y excreción de melaza sobre las estructuras de éstas; dichos daños son propicios para que enfermedades producidas por hongos puedan crecer sobre ello dando un aspecto desagradable, esto puede degradar la calidad de la fruta y en algunas plantas reducir el efecto fotosintético de las hojas [3, 4].

La disminución del rendimiento de los cultivos debido al ataque de plagas es en un 20 a 30% en la mayoría de cultivos; el mayor porcentaje de

control de dichas plagas son con plaguicidas de síntesis química de alto impacto negativo para el medio ambiente, para los organismos benéficos y para los consumidores [5]. Las consecuencias de las aplicaciones de químicos de amplio espectro son fatales para la salud humana. Nava, *et al.* (2012) de acuerdo con la OMS estimó que anualmente cerca de un millón de personas son intoxicadas con plaguicidas químicos y entre cinco mil y veinte mil de ellos fallecen; el 50% de los fallecidos por intoxicación con estos químicos son agricultores y los demás son envenenamiento por consumo de alimentos contaminados [6, 7]. Por esta razón se presenta como alternativa amigable a los extractos vegetales denominados plaguicidas biológicos, bioplaguicidas o biocidas.

Los insecticidas de origen vegetal o biocidas constituyen una alternativa para los insecticidas químicos; estos insecticidas biológicos son obtenidos de partes de plantas que han desarrollado resistencia al ataque de plagas, esta resistencia se basa en la producción de compuestos activos (metabolitos secundarios) para inhibir o contrarrestar dichos ataques; siendo algunos de estos compuestos las saponinas, taninos, alcaloides, terpenoides, entre otros. Existen al menos cien mil compuestos activos de bajo peso molecular denominados metabolitos secundarios derivados de plantas y diez mil de ellos han sido desarrollados como adaptación a las plagas [7]. Los biocidas pueden demostrar su efecto sobre las plagas de los cultivos de diversas formas, los principales efectos son: toxicidad (con ello la mortandad o repelencia); inhibición de crecimiento; supresión del comportamiento reproductivo y reducción de la fertilidad [7].

Actualmente existen una gran cantidad de productos derivados de extractos vegetales con efecto de control sobre las plagas; estos biocidas son de fácil degradación en el medio ambiente ya que son derivados de plantas y no poseen efectos adversos sobre animales [5]; en esta investigación se utilizaron las plantas denominadas *Agave murpheyi* f. variegata “agave” y *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta”.

El Agave “maguey” es una planta suculenta, pertenece a la familia de las Agavácea, siendo esta originaria de México. También es conocida bajo los nombres de Agave amarillo, Pita, Pitón, Alcibara, Maguey, Cardón, entre otros[8, 9]. El Agave puede alcanzar hasta los 2 metros de altura y no presenta tallo por lo que las hojas salen desde la base, dichas hojas son lanceoladas con espinas en la punta y con bordes de color verde grisáceo o azulado con márgenes amarillos, muy carnosos, rígidos y en ocasiones curvadas por su peso. Florece sólo una vez y cuando termina la floración, la planta muere[10]. Existen varios estudios del género Agave que han demostrado la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios como saponinas, glicósidos cardíacos, esteroides, taninos y flavonoides[11]. En este género las saponinas esteroidales pertenecen en su mayoría al grupo de las hecogeninas, mostrando concentraciones bastante altas y siendo estas las más estudiadas, presentando actividad molusquicida bien documentada[12].

La Azorella “yareta” es una hierba perenne que en conjunto forman cojines compactos de varios metros de diámetro, es denominada yareta, yarita, champa o cojines, son especies longevas que pueden llegar a vivir más de 500 años. Su crecimiento es lento e inicia su desarrollo en bloques de rocas y no en suelos descubiertos[13, 14]. Esta planta se distribuye en Perú, Bolivia, Chile y noroeste de Argentina pudiendo crecer en las laderas y montañas de entre 2800 hasta los 5200m sobre el nivel del mar, siendo una de las especies que alcanza mayores altitudes a nivel mundial. Los extractos etanólicos de yareta poseen alto efecto ovicida sobre *T. urticae* al mismo nivel que los químicos utilizados como control positivo, también un efecto acaricida moderado sobre la misma especie[13, 14]. Un estudio fitoquímico de *Azorella compacta* demostró que esta planta posee una gran cantidad de metabolitos secundarios[15, 16].

Por tal razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto bioinsecticida de los extractos etanólicos de *Agave murpheyi F. Gibson*

forma *variegata* “agave” y *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta” frente a *Planococcus citri* “chanchito blanco”. Así mismo se evaluó el efecto bioinsecticida de las plantas antes mencionadas en diferentes tiempos y concentraciones frente al *Planococcus citri* de la vid; con el fin de obtener un producto natural a base de plantas que puedan controlar el ataque de dichos insectos y con ellos disminuir la aplicación de productos químicos.

II. ANTECEDENTES

No se encontraron referencias sobre la aplicación de los extractos de *Agave murpheyi* F. Gibson forma variegata "agave" y *Azorella diapensioides* A. Gray "yareta" frente a la plaga *Planococcus citri* "chanchito blanco", tampoco se encontraron referencias de la aplicación de los extractos de los géneros Agave y Azorella frente a la misma plaga, por este motivo se cita como antecedentes a los efectos insecticidas, acaricidas, fungicidas, bactericidas, entre otros de los extractos de dichas plantas.

- **VILLAVICENCIO, N. *et al.* 2010.** Hidalgo, México; sustentan que los productos obtenidos de varias especies de agaves poseen actividad biológica en diferentes organismos de prueba, es así que en este estudio realizaron entrevistas para obtener información acerca de las plantas que se utilizaban para el control de plagas, donde se obtuvo que utilizan un producto elaborados a base de los compuestos del género agave. Esto puede ser corroborado con el estudio realizado por DHARMASHAKTU., *et al*, 1987; citado por Villavicencio en el 2010, en donde demuestra que los extractos de hojas de *Agave americana* a una concentración de 0.08% causaron 100% de mortalidad en larvas de mosquitos de los géneros *Anopheles, Aedes* y *Culex* [17].

- **NEIRA, M. Y VELASTEGUÍ, R. 2010**. Nevado, Ecuador; Sustentan la presencia de glucósido espirostanol, saponinas, saponinas esteroidales y derivados de tetratriacontanol en el *Agave americana*. La parte suculenta del *Agave americana* que se había empleado para la obtención de extractos, posee en su composición tanto de las hojas como de la raíz, saponinas, pero la raíz posee mayor cantidad que en las hojas. Esto indicó que el efecto fungicida del extracto de agave se

debe a la cantidad de saponinas presentes en cada parte de la planta, debido a ello el extracto de la raíz del agave es mucho más efectivo para el control de oídio que el de las hojas[18]. También reporta que este y otros estudios sobre *Agave americana* demuestran que esta planta posee saponinas: agavasaponina E, agavasaponina y otros compuestos como el tetratriacontanol, tetratriacontyl hexadecanoato y un nuevo 2-tritriacontylcromina que han sido aislados de *Agave americana* L., dos de estos compuestos exponen significativa actividad antibacteriana[18].

- **FUERTES, C. *et al*. 2010**. Lima, Perú; Realizaron un estudio con el fin de favorecer la disminuir de plaguicidas aplicados en los cultivos y dar como alternativa extractos inocuos para los cultivos y suelos, pero con efecto en las principales plagas que atacan a los cultivos. Iniciaron con la colecta de 40 especies de plantas con propiedades biocidas, entre las especies más relevantes se encontró al *Agave americana*. Los extractos se obtuvieron por la metodología de extracción acuosa. Entre las especies biocidas que han mostrado resultados expectantes por sus propiedades plaguicidas en favor del algodonero se encuentran: *Agave americana, Lonchocarpus nicou, Hura crepitans y Cissampelos grandifolia.* Después de las cuatro aplicaciones de los extractos liofilizados, el extracto de *Agave americana* (maguey) mostró un efecto significativo sobre *Aphis gossypii* y no presentó efecto dañino contra los controladores biológicos, las poblaciones permanecieron intactas, lo cual constituye una ventaja con relación a los insecticidas no naturales[19].

- **IANNACONE, J. e*t al*. 2013.** Lima, Perú; Demostraron en los tamizajes fitoquímicos del género *Agave*, la presencia de algunos metabolitos secundarios como saponinas, glicósidos cardíacos, esteroides, taninos y flavonoides. Las hecogeninas muestran concentraciones bastante

altas y son las más estudiadas, presentando actividad molusquicida bien documentada. Los mayores efectos sobre *M. tuberculata* se observaron en el extracto acuoso de las hojas de *A. americana*, siendo considerado como un buen sustituto para el molusquicida niclosamida, disponible comercialmente, y que pueden ser empleados en forma segura para el control de caracoles vectores-transmisores de trematodos[12].

- **TELLO, V. et al. 2014.** Iquique, Chile; Evaluaron el efecto acaricida de seis extractos metanólicos de seis plantas diferentes en donde la yareta mostró el efecto más importante sobre los huevos de ácaros. La *Azorella compacta* posee una gran cantidad de compuestos que pueden ser utilizados en la agricultura para el control o repelencia de plagas. Estudios realizados a esta planta demuestran que los extractos obtenidos poseen una gran cantidad de terpeno, siendo uno de los más abundantes el azorellanol. Dichos extractos fueron utilizados para el control de huevos de *T. urticae* y demostró que tiene una gran eficacia sobre estos. También se demostró en este mismo estudio que posee efecto acaricida en un nivel moderado[15].

- **LOYOLA, L. *et al.* 2004.** Antofagasta, Chile; Analizaron el efecto inhibitorio de cinco diterpenoides aislados de la planta *Azorella compacta* frente a *Plasmodium berghei* en donde se inyectaron intraperitonealmente ratones con una cantidad de 108 glóbulos rojos parasitados (de 10 mg / kg / día) y posteriormente procedieron a determinar el efecto supresor de la malaria, mediante el examen de frotis sanguíneo teñido con Giensa, para eso se tomó muestras de sangre de las colas de los ratones. Los resultados de este estudio proporcionaron una primera evidencia de la actividad antiplasmodial de los diterpenos del tipo mulinano aislados de fuentes naturales[20].

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por:

- 1 kilogramo de muestras de *Azorella diapensioides* “yareta”.
- 1 kilogramo de muestras de *Agave murpheyi* “agave”.
- Especímenes de *Planococcus citri* “chanchito blanco” criados en laboratorio.
- Semillas de *Solanum tuberosum* “papa” germinadas.
- Muestras de zapallos de la variedad punky.

3.2. Método

3.2.1. Identificación de las plantas colectadas.

Las muestras de *A. murpheyi* “agave”, fueron colectadas en el departamento y provincia de Ica. (Anexo 1, figura 03) y las muestras de *A. diapensioides* “yareta”, fueron colectadas en la Reserva Nacional Pampa Galeras-Bárbara d'Achille. (Anexo 1, figura 04). Ambas plantas fueron enviadas al Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde se realizó su identificación taxonómica. Las muestras de yareta fueron identificadas como *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta” y las muestras de agave fueron identificadas como *Agave murpheyi* f. variegata “agave” respectivamente. (Anexo 2a).

3.2.2. Elaboración de los extractos etanólicos.

3.2.2.1. Recolección, secado y fragmentación de las plantas.

Las muestras de las plantas fueron colectas en horas de la mañana para captar todos los metabolitos que se pudieran perder con el sol, mantener la humedad y la turgencia de las plantas[21]. Para el *A. murpheyi* “agave” solo se realizó colecta de hojas y para la *A. diapensioides* “yareta” se realizó colecta de la planta completa (hojas, tallos y raíz), estas muestras fueron manipuladas con mucho cuidado para que estén en buen estado[21] (Anexo 3, figura 5a y 5c). Luego se procedió al secado de las muestras al ambiente libre, bajo sombra, por aproximadamente dos semanas; para el caso de la planta suculenta *A. murpheyi* “agave” se procedió a realizar la extracción de los compuestos con el vegetal recién cortado. Posteriormente se procedió con la fragmentación de las muestras, estas fueron cortadas en porciones de 5 mm con ayuda de cuchillas, por último, se procedió a almacenar las muestras fragmentadas en los recipientes de vidrio para la obtención de los extractos[22]. (Anexo 3, figura 6a y 6b).

3.2.2.2. Obtención de los extractos por reflujo.

Se realizó la extracción de los compuestos secundarios con etanol como solvente en una extracción continua. Se empleó el método del reflujo, este método desarrolla destilación por arrastre de vapor y así facilita la extracción de los principios activos, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos volátiles [23, 24].

Se pesó 200 g de material vegetal seco y picado en el caso de *A. diapensioides* “yareta” y material vegetal fresco y picado en el caso de *A. murpheyi* “agave”, estos fueron dejados macerando en etanol al 96% por 48 horas con agitaciones frecuentes. Pasados las 48 horas se separó el solvente del sustrato y dicho sustrato se colocó en un matraz, obteniéndose un matraz por cada muestra de planta[23]. Se colocó sobre la boca del matraz un tapón de goma con una varilla de vidrio (reflujo), posteriormente se llevó a una fuente de calor hasta que llegue a la ebullición y el vapor fue condensado gracias al enfriamiento de la varilla[23,25]. (Anexo 3, figura 7).

Se realizó la extracción de los compuestos secundarios por un espacio de 8 horas por cada muestra, luego se procedió al filtrado del solvente y se juntaron ambos solventes que contenían los compuestos secundarios (el obtenido del macerado con el obtenido del reflujo), finalmente se llevó a concentrar en el rotaevaporador hasta obtener los extractos semi secos; durante este proceso el solvente es reciclado, permitiendo obtener mayor cantidad del extracto y el ahorro del solvente[23, 25]. Los extractos semi secos se dispusieron en platos de porcelana forrados con papel aluminio hasta dejar evaporar el solvente residual [25]. (Anexo 3, figura 8 y 9).

3.2.2.3. Conservación de los extractos.

Los extractos que se obtuvieron del raspado de los platos de porcelana se colocaron en placas y se cubrieron con papel, posteriormente se dispusieron en refrigeración hasta su utilización.

De acuerdo a Corpas y Barriga (1993), es muy importante la conservación de los extractos vegetales por ello se debe cumplir con las siguientes condiciones[23]:

- Se deben conservar protegiéndolos de la luz (Frascos de vidrio oscuros cubiertos con papel aluminio).
- Los envases deben estar bien tapados.
- También se debe de mantener en oscuridad a 4 ° C hasta su análisis[26].

3.2.2.4. Realización del screening fitoquímico de *Azorella diapensioides* "yareta".

Las determinaciones se realizaron siguiendo el protocolo diseñado por la Dra. Olga Lock Sing. Las modificaciones se realizaron mediante comunicación personal con la asesora Haydee Chávez Orellana y se tomó como referencia a otros autores.

El extracto se dividió en fracciones con solventes de diferentes polaridades, obteniéndose las fracciones A, B, C, D, E [27, 28.]

- **Fracción A: Fue el extracto obtenido por maceración y reflujo (extracto propiamente dicho).**

  Se colocó 20 g del extracto (Fracción A) en un vaso precipitado y se añadió 130 ml de ácido clorhídrico (HCL) al 1%, se homogenizó y se pasó por un papel filtro, en donde se obtuvo una parte soluble y una insoluble; la parte insoluble fue la **Fracción B** y la parte soluble se siguió trabajando para obtener las demás fracciones. La fracción B se lavó con agua

destilada para quitar los residuos del ácido clorhídrico [27]. (Anexo3, figura 10).

A la parte insoluble (extracto + HCL) se le añadió 2 ml de hidróxido de amonio para alcalinizar y se midió con papel de tornasol (vira de rojo a morado para alcalino). Se dispuso esta solución en un embudo de decantación y se añadió 100 ml de diclorometano, se mezcló agitando bruscamente el embudo de decantación y se liberó el gas que emitía, esta acción se repitió varias veces hasta obtener poca liberación de gas. En esta reacción se formó 2 partes, la superior de color verde y la inferior de color transparente, se extrajo la parte transparente y se filtra con papel filtro doble, esta fue la **Fracción C**. Luego se añadió 100 ml de diclorometano y se repitió la acción [27].

Se preparó una solución de 40 ml de etanol y 60ml de diclorometano y se realizó agitación constante y liberación de gas (se repitió la acción anterior). De la misma forma, se dividió en una parte superior verde y una parte inferior transparente, se filtró la parte transparente con papel filtro y esta correspondió a la **Fracción D**; la otra parte de color verde oscuro correspondió a la **Fracción E**. (Anexo 3, figura 11a y 11b).

Una vez obtenidas todas las fracciones, se procedió a realizar las reacciones para determinar los grupos de compuestos secundarios [27].

- **Reacción de Shinoda: Determinación de flavonoides en la Fracción A, D y E.**

Se dispuso una alícuota de la fracción a utilizar sobre placas excavadas, posteriormente se añadió limadura de magnesio y gotas de HCL concentrado y se observa la reacción con un viraje de color verde a rojo; esto indicó la presencia de flavonoides en el extracto [27, 28,29]. (Anexo 3, figura 12).

- **Reacción de Rosenheim: Determinación de leucoantocianidinas en Fracción E.**

  Se agregó 1 ml de HCL concentrado en 1 ml de la fracción E y se puso a calentar en baño maría a 50°C durante 10 minutos aproximadamente y se dejó enfriar. Se añadió 2 ml de agua destilada, 2 ml de alcohol anhidro, se agitó y se observó la fase superior: En donde se observó de color verde que indicaba la presencia de leucoantocianidinas [27, 30].

- **Reacción de Taninos: En Fracción A.**

  Se agregó una fracción del extracto de la Fracción A y 8 ml de agua destilada estéril, luego se dispuso en 4 tubos de ensayo: Tubo1: Se añadió 1 ml de cloruro de sodio al 5%, Tubo 2: Se añadió 1ml de solución de gelatina, Tubo 3: Se añadió 1 ml de solución de gelatina y 1ml de cloruro de sodio al 5% y al Tubo 4: Fue el control para la comparación. La reacción no viró de color y no precipitó la gelatina, siendo esto indicador de ausencia de taninos [27, 28].

- **Reacción de Ninhidrina: Determinación de Aminoácidos en Fracción A.**

  Se agregó una gota de la Fracción A sobre un papel filtro, se dejó secar y se agregó una gota de ninhidrina al 0.2%, finalmente se puso el papel filtro

en una estufa a 110 a 120°C y se observó una mancha de color violeta lo cual indicó la presencia de aminoácidos [27, 29]. (Anexo 3, figura 13).

- **Reacción de terpenos y esteroides: en Fracción D y C.**

  Se disolvió una alícuota con diclorometano, se pasó con ayuda de una espátula a una placa excavada, se añadió 4 gotas de anhídrido acético, 2 gotas de ácido sulfúrico y se puso en calor; el cambio de color demostró la presencia de terpenos y esteroides [27, 28].

- **Detección de Cardenólidos: Fracción C.**

  Se disolvió una alícuota de la Fracción C en 2 ml de HCL al 1%, se dispuso en una placa excavada en cuatro pozos; En el primer pozo se agregó una gota del reactivo Dragendorff, en el segundo pozo se agregó 1 gota del reactivo Mayer, en el último pazo se agregó 2 gotas del reactivo Wagner y se emulsionó. Las reacciones no indicaron positivo para esta determinación [27, 28].

- **Reacción de Lieberman - Buchard: Determinación de Catequinas. Fracción D.**

  Se disolvió una alícuota de la Fracción D en 2 ml de etanol, se agregó 1ml de metanol, se agregó 0.5 ml de HCl y se puso en baño maría durante 10 minutos; Se dejó enfriar y se añadió 2ml de agua más 0.5 ml de alcohol amílico. La reacción determinó la presencia de catequinas [27].

3.2.3. Crianza de *Planococcus citri* "chanchito blanco" en laboratorio.

3.2.3.1. Producción de brotes de *Solanum tuberosum "*papa" y obtención de zapallo.

Las semillas de *S. tuberosum* "papa" fueron de variedad peruanita de entre 40 a 65 g aproximadamente y aquellas que tuvieron una gran cantidad de yemas, evitando aquellas que tuvieran cualquier tipo de daño.

Para la producción de los brotes etiolados de *S. tuberosum "*papa" se inició con el tratamiento de las semillas con un antifúngico para evitar la proliferación de hongos. También se aplicó un activador de brotes (Activol) a las semillas para que las yemas u ojos emerjan simultáneamente. Según Quirós y Oyarzún el sustrato estuvo constituido por tierra y arena y esto fue modificado por los autores con la adición de humus en una mezcla en proporciones de 1:1:1. El sustrato también fue tratado previamente con un antifúngico y se colocó en una caja de cartón para que conserve la humedad, una vez se trataron los tubérculos, estos se dispusieron en el sustrato separados en 10 cm uno de otro aproximadamente [31,32]. Las cajas se colocaron en una sala oscura para evitar la fotosíntesis y el crecimiento excesivo de los brotes (evitar con ello acortar la vida del brote) [33]. Después de 30 días se obtuvieron brotes de entre 10 a 20 cm y se procedió a la cosecha de estos. (Anexo 3, figura 14).

Los frutos de zapallos de la variedad punky se obtuvieron del laboratorio de control biológico del Servicio Nacional de Sanidad Agraria.

3.2.3.2. Inoculación y producción de *Planococcus citri* "chanchito blanco"

- ✓ Una vez obtenidos los brotes etiolados de *S. tuberosum* "papa", se cosecharon cortando las raíces y quitando la mayor cantidad de tierra posible. Las papas con brotes se dispusieron en tapers número 5 con las tapas cortadas y forradas con tela para dar una buena aireación, también se puso papel Kraft en la base entre el taper y las papas y se colocó una tela de color negro para proporcionar las condiciones adecuadas de reproducción. (Anexo 3, figura 14).

  El inóculo de *P. citri* "chanchito blanco" fue proporcionado por el laboratorio de investigación de controladores biológicos del CITEagroindustrial, estos fueron inoculados en los brotes de papa puestos en los tapers para así proliferar y obtener una gran cantidad de ejemplares. Las tapers con los brotes de papa inoculados fueron almacenados a temperaturas entre 22 a 25°C, con el fin de proporcionar un ambiente adecuado para que dichos insectos se reproduzcan de manera adecuada [33,29].
- ✓ Una vez obtenidos los zapallos se dispusieron en taper con las mismas condiciones para los brotes de papas y se realizó la inoculación del *P. citri* "chanchito blanco" sobre el zapallo. Se dispuso con las mismas condiciones de temperatura y oscuridad. (Anexo 3, figura 15).

3.2.4. Medición de la efectividad bioinsecticida de los extractos.

3.2.4.1. Preparación de las concentraciones y testigos.

El extracto solido de *A. murpheyi* “agave” se diluyó en una solución de agua - tween al 15% y el extracto solido de *A. diapensioides* “yareta” se diluyó en una solución de agua - tween al 30%, esto de acuerdo a la cantidad de tween utilizado para diluir los extractos. El control positivo fue Kohinor 350 SC aplicado de acuerdo a las indicaciones del fabricante. (Anexo 3, figura 16).

Cada uno de los extractos fueron diluidos para obtener la cantidad suficiente para aplicar a todas las repeticiones que se tuvieron. Se prepararon cuatro diluciones para el extracto de *A. murpheyi* “agave” a diferentes concentraciones de 10%, 25%, 50% y 75% y para el extracto de *A. diapensioides* “yareta” de la misma manera se realizaron cuatro diluciones a diferentes concentraciones 10%, 25%, 50% y 60%; donde se evaluó la efectividad de los extractos, esto reflejado por la mortandad de individuos que ocasionaron[34]. (Anexo 3, figura 17).

3.2.4.2. Actividad bioinsecticida

Bioensayos

Una vez que se prepararon las dosis de ambos extractos, estos fueron aplicados de la siguiente manera: Los ensayos se realizaron en condiciones controladas en cámara climática (Fitotrón) a 24°C ± 2 grados, a una humedad relativa (HR) 65% y 12 horas luminosidad. Dichos ensayos se realizaron en envases de plástico de 7 cm de altura y 12 cm de diámetro con un volumen de un litro aproximadamente; las tapas tuvieron una abertura

circular en la parte superior y fue cubierta con tela para dar ventilación y evitar las concentraciones de vapores. En cada envase se colocó un papel filtro en la base, una papa germinada (brotes etiolados) y se añadió entre 10 a 40 individuos de *P. citri* (obtenidos de la crianza en laboratorio), esto se realizó una hora antes de iniciar las aplicaciones[21, 35, 36]. (Anexo 3, figura 18). Se tuvieron cinco envases, cada uni con una papa germinada y 25 individuos de *P. citri* en promedio, esto representó las repeticiones de dichos ensayos y fue realizado para cada una de las concentraciones de los extractos. La aplicación de los extractos vegetales se realizó por la técnica de aspersión a través de atomizadores manuales, en donde se asperjó 1 ml del extracto en toda la papa que se encontraba dentro del envase (al fondo del táper un papel filtro para absorber el excedente), de la misma manera se aplicó el control positivo (Kohinor) y el control negativo (Agua-Tween)[35,36]. (Anexo 3, figura 19). Después de la aplicación de las diferentes dosis del extracto se contabilizó el tiempo para hacer los registros sobre el porcentaje de *P. citri* muertos en tiempos de 5 y 24 horas [21, 35, 36]. Se realizó modificaciones en la medición de los tiempos propuestos en el perfil, esto según las observaciones que se realizó durante el desarrollo de los ensayos.

3.2.4.3. Variable de respuesta evaluada

La mortandad se determinó por el total de insectos muertos sobre el total de insectos al inicio del ensayo, se consideró muertos aquellos individuos que al ser

rozados con un estilete no mostraron motilidad. La mortandad observada en los controles se descontó mediante la fórmula de Abbott (1995) [34, 37].

$$\%\ \textbf{Mortalidad corregida} = \left(\frac{\%\ \text{mt} - \%\ \text{mta}}{100 - \%\ \text{mta}}\right) \text{X}\ 100$$

Donde[36]:

- ✓ **mt =** mortandad en el tratamiento.
- ✓ **mta =** mortandad en el tratamiento testigo (control negativo).

3.2.4.4. Análisis estadístico

Para los bioensayos, el diseño experimental fue completamente al azar. Para la corrección de la mortandad en el tratamiento negativo se utilizó la fórmula de Abbott[15,34]. Para la eficiencia de los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia de α=0,05, en donde no fue necesario realizar la normalización de los datos ya que éstos cumplían con el supuesto de normalidad [15, 36]. Se aplicó la misma metodología para los extractos de las dos plantas.

IV. RESULTADOS

Durante la investigación se determinó que los extractos evaluados en sus diferentes concentraciones tienen efectos insecticidas sobre los individuos de *Planococcus citri* de la vid. Esto evidenciado por la disminución o muerte de los individuos de *Planococcus citri* al ser aplicados con los extractos y evaluados a las 5 y 24 horas.

4.1. Efecto bioinsecticida de *Azorella diapensioides* A. Gray "yareta".

Tabla 1. Porcentaje de mortandad de *Planococcus citri* frente a los extractos de *A. diapensioides* en diferentes concentraciones y tiempos de evaluaciones.

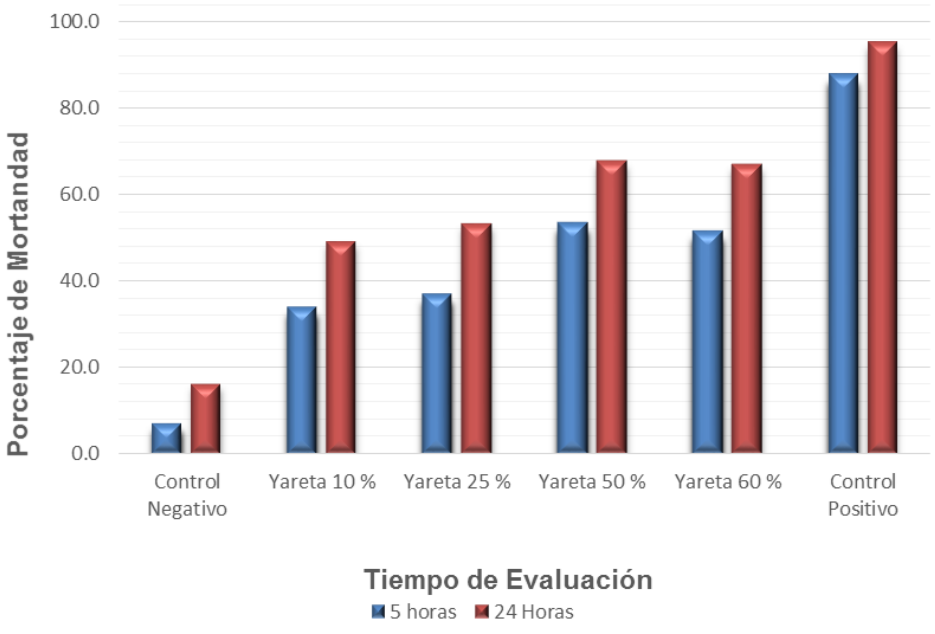
Tratamiento	Descripción	Población	% mortandad a 5 horas	% mortandad a 24 horas
T1	Testigo	16	7.3	16.2
T2	Yareta 10%	16	34.1	49.2
T3	Yareta 25%	16	37.2	53.2
T4	Yareta 50%	16	53.6	68.0
T5	Yareta 60%	14	51.7	67.0
T6	Control positivo	16	87.9	95.3

Tabla 2. Porcentaje de mortandad corregida de *Planococcus citri* frente a los extractos de *A. diapensioides* "yareta" en diferentes

Tratamiento	Descripción	Población	% mortandad a 5 horas	% mortandad a 24 horas
T1	Testigo	16	0.0	0.0
T2	Yareta 10%	16	28.9	39.4
T3	Yareta 25%	16	32.3	44.1
T4	Yareta 50%	16	49.9	61.8
T5	Yareta 60%	14	47.9	60.7
T6	Control positivo	16	86.9	94.4

concentraciones y tiempos de evaluaciones, según Abbott (1995).

- ✓ La población fue el promedio de 5 repeticiones que se realizaron para cada tratamiento, donde se contaron los individuos de *A. d*



oides “yareta” que se encontraron sobre el tubérculo o los brotes. Los porcentajes de mortandad fueron los colectados directos y estos fueron ajustados para descontar los porcentajes obtenidos en los controles negativos.

Figura1. Comparación entre los porcentajes de mortandad de las evaluaciones de 5 y 24 horas con los datos no ajustados de los extractos de *A. diapensioides* “yareta”**.**

- ✓ El mayor efecto insecticida fue del extracto al 50% con 61.8% de mortandad, superando a la concentración de 60% con 60.7% de mortandad; el menor efecto insecticida fue del extracto al 10% con 39.4% de mortandad.
- ✓ En todos los extractos de *A. diapensioides* “yareta” de las diferentes concentraciones aplicadas directamente a los individuos de *P. citri*, resultaron con cambios morfológicos, como la pérdida parcial o completa de la capa cerosa que recubre a estos individuos. Esto comparado con el control positivo en donde se obtuvo la mortandad completa pero no se observó la pérdida de la capa cerosa de los individuos de *P. citri* (Anexo 3, figura. 20).
- ✓ Se observó que ciertos individuos de *P. citri* reaccionaron a la aplicación con secreciones amarillentas en la parte terminal del cuerpo (Anexo 3, figura. 21).
- ✓ A las 24 horas de aplicados los extractos de *A. diapensioides* “yareta”, se observó que aún persistía extracto en los tubérculos, a diferencia de la aplicación del control negativo y positivo que al cabo de 5 horas ya se había evaporado (Anexos 3, figura. 22).
- ✓ Para realizar la dilución del extracto de *A. diapensioides* “yareta” se necesitó mayor cantidad de tween y se tuvo complicaciones para diluir el extracto al 60% debido a su poca solubilidad con el agua.

Tabla 3. Porcentaje de mortandad acumulada a las 24 horas mostrando las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y los tratamientos testigos (ANOVA).

Tratamiento	Descripción	% mortandad	Diferencias
T1	Testigo	16.2	A
T2	Yareta 10%	49.2	B
T3	Yareta 25%	53.2	B
T4	Yareta 50%	68.0	C
T5	Yareta 60%	67.0	C
T6	Control positivo	95.3	D

- ✓ Las medias con la letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba LSD de Fisher. Existe diferencia significativa de los tratamientos al 10% y 25% frente a los tratamientos al 50% y 60%. También existe diferencia significativa del control negativo frente a los demás tratamientos, según ANOVA.

4.2. Efecto bioinsecticida de *Agave murpheyi F. Gibson forma variegata "agave".*

Tabla 4. Porcentaje de mortandad de *P. citri* frente a los extractos de

Tratamiento	Descripción	Población	% mortandad a 5 horas	% mortandad a 24 horas
T1	Testigo	22	2.7	16.3
T2	Agave 10%	20	11.5	31.6
T3	Agave 25%	20	14.6	42.5

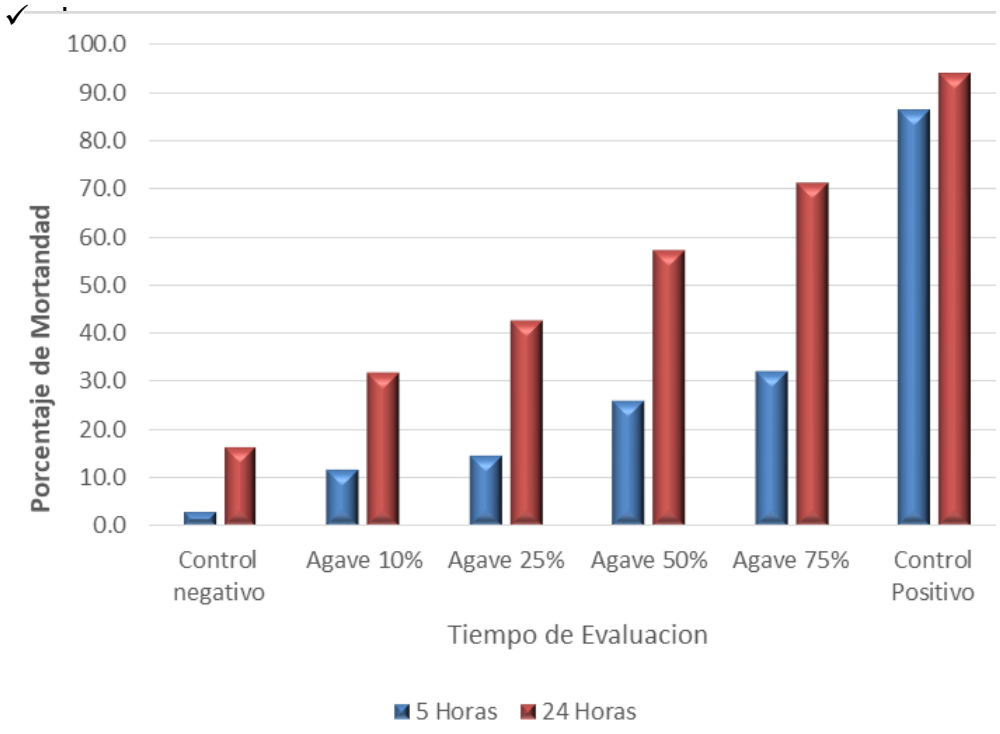
A. murpheyi en diferentes concentraciones y tiempos de evaluación.

T4	Agave 50%	21	25.9	57.1
T5	Agave 75%	21	32.0	71.1
T6	Control positivo	20	86.2	94.0

Tabla 5. Porcentaje de mortandad corregida de *Planococcus citri* frente a los extractos de *A. murpheyi* en diferentes concentraciones y

Tratamiento	Descripción	Población	% mortandad a 5 horas	% mortandad a 24 horas
T1	Testigo	22	0.0	0.0
T2	Agave 10%	20	9.0	18.3
T3	Agave 25%	20	12.2	31.3
T4	Agave 50%	21	23.8	48.8
T5	Agave 75%	21	30.1	65.5
T6	Control positivo	20	85.8	92.8

tiempos de evaluaciones.



ión fue el promedio de 5 repeticiones que se realizaron para cada tratamiento, donde se contaron los individuos de chanchito blanco que se encontraron sobre el tubérculo o los brotes. Los porcentajes de mortandad fueron los colectados directos y estos fueron ajustados para descontar los porcentajes obtenidos en los controles negativos.

Figura 2. Comparación entre los porcentajes de mortandad de las evaluaciones de 5 y 24 horas con los datos no ajustados de los extractos de *A. murpheyi* “agave”.

- ✓ El mayor efecto insecticida fue del extracto al 75% con 65.5% de mortandad y el menor efecto insecticida fue del extracto al 10% con 18.3% de mortandad.
- ✓ En los extractos de *A. murpheyi* “agave” de las concentraciones de 50 y 75% aplicadas directamente a los individuos de *Planococcus citri*, resultaron con cambios morfológicos, como la pérdida parcial de la capa cerosa que recubre a estos individuos.

Tabla 6. Porcentaje de mortandad acumulada a las 24 horas mostrando las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados y los tratamientos testigos (ANOVA).

Tratamiento	Descripción	% mortandad	Diferencias
T1	Testigo	16.3	A
T2	Agave 10%	31.6	B
T3	Agave 25%	42.5	C
T4	Agave 50%	57.1	D
T5	Agave 75%	71.1	E
T6	Control positivo	94.0	F

- ✓ Las medias con la letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05) según la prueba LSD de Fisher. Existe diferencia significativa entre todos los tratamientos de *A. murpheyi* aplicados. Existe diferencia significativa del control negativo frente a las diferentes concentraciones, según ANOVA.

4.3. Diferencia del efecto bioinsecticida por tratamiento de *Agave murpheyi F. Gibson forma variegata "agave"* y *Azorella diapensioides* A. Gray "yareta".

Cada uno de los tratamientos fueron comparados entre las mismas concentraciones para determinar la diferencia de mortandad entres los extractos de las dos plantas (T2 de yareta frente a T2 de agave; T3 de yareta frente a T3 de agave; T4 de yareta frente a T4 de agave y de la misma forma los tratamientos positivos y negativos).

Tabla 7. Comparación de los porcentajes de mortandad y la diferencia significativa entre los tratamientos de la misma concentración de los extractos de *A. murpheyi* y *A. diapensioides* frente a *Planococcus citri*.

Tratamiento	Descripción	% mortandad a 24 horas	Diferencia
T1	Testigo Yareta	16.2	A
T1	Testigo Agave	16.3	A
T2	Yareta 10%	49.2	A
T2	Agave 10%	31.6	B
T3	Yareta 25%	53.2	A
T3	Agave 25%	42.5	A
T4	Yareta 50%	68.0	A
T4	Agave 50%	57.1	B

T5	Yareta 60%	67.0	A
T5	Agave 75%	71.1	B
T6	Control + Yareta	95.3	A
T6	Control +Agave	94.0	A

- ✓ Para cada una de los tratamientos, las medias con la letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba LSD de Fisher. Existe diferencia significativa entre los extractos de los tratamientos T2; T4 y T5 según ANOVA. Los tratamientos T1 y T6 no existe diferencia significativa ya que son repeticiones de los ensayos.
- ✓ Para los tratamientos T2 hay diferencia de mortandad de un 20% para *A. diapensioides* y para el T3 y T4 de ambos extractos se diferenciaron en un 11% de mortandad para *A. diapensioides*.

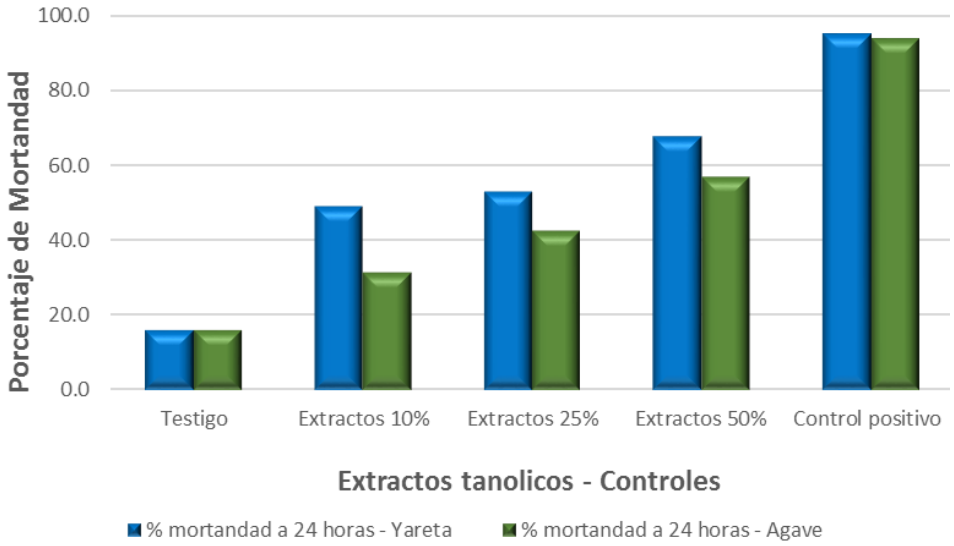


Figura 3. Comparación entre los porcentajes de mortandad de las evaluaciones de 5 y 24 horas con los datos no ajustados de los extractos de *A. murpheyi* “agave” y *A. diapensioides* “yareta”**.**

4.4. Screening fitoquímico de *Agave. murpheyi* “agave”.

Tabla 8. Resultados del screening fitoquímico de *Agave murpheyi* f. variegata “agave”: Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *A. murpheyi*.

Tipos de Metabolitos	Extracto Etanólico	Tipos de Metabolitos	Extracto Etanólico
Grasas y Aceites	+	Saponinas	+++
Alcaloides	-	Fenoles y Taninos	++
Lactonas	-	Aminoácidos Libres	+++
Cumarinas	-	Quinonas	-
Triterpenos y/o Esteroides	+	Flavonoides	+
Catequinas	+	Antocianidinas	-
Resinas	-	Mucilagos	-
Azucares Reductores	++		

- ✓ Los principales grupos de metabolitos secundarios encontrados en la planta *A. murpheyi* “agave” fueron las saponinas y los aminoácidos libres con una cuantificación de tres cruces, lo cual indica la presencia en abundancia de estos compuestos. (Anexo 2b).

4.5. Screening fitoquímico de *Azorella diapensioides “yareta”*.

Tabla 9. Resultados del screening fitoquímico de *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta”: Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *A. diapensioides*.

Tipos de Metabolitos	Extracto Etanólico

Grasas y Aceites	Positivo
Alcaloides	Negativo
Catequinas	Positivo
Terpenos y/o Esteroides	Positivo
Cardenólidos	Negativo
Aminoácidos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Leucoantocianidinas	Positivo
Taninos	Negativo

- ✓ Los principales grupos de metabolitos secundarios encontrados en la planta *A. diapensioides* “yareta” fueron los flavonoides, catequinas y terpenos. Las determinaciones se realizaron determinando la presencia y ausencia de cada grupo de puestos secundarios (Anexo 2b).

V. DISCUSIÓN

Los extractos etanólicos obtenidos de la planta completa de *Azorella diapensioides* “yareta” y de las hojas de *A. murpheyi* aplicados para el control de *Planococcus citri* “chanchito blanco”, obtuvieron un efecto insecticida considerable. En todos los tratamientos de ambos extractos se

obtuvo diferencia significativa con respecto al testigo, siendo las concentraciones del 50 y 75% de más efectividad.

Para el extracto de *Azorella diapensioides* A. Gray “yareta” se obtuvo una mortandad del 61.8% con una concentración de extracto aplicada al 50%, comprobando así el efecto insecticida de dicha planta. Estos resultados se pueden comparar con lo reportado por Borkosky, et al. (2016) con otras especies de yareta como es la *Azorella compacta*, los extractos de esta especie fueron aplicados como insecticida a escala de laboratorio frente a *Spodoptera frugiperda* [38]. También concuerda con lo reportado por Tello, *et al*. (2014), en donde se aplicó un extracto metanólico de *Azorella compacta* sobre adultos de *Tetranychus urticae* “arañita roja” y se obtuvo una mortandad superior al 50% y 100% de mortandad al ser aplicado a los huevos de dicha plaga[15].

Para el extracto de *Agave murpheyi* forma variegata “agave” se comprobó el efecto insecticida sobre *Planococcus citri* “chanchito blanco” con una mortandad de un 71% de los individuos con una concentración de extracto aplicado al 65.5%. Esto se puede comparar con los efectos insecticida o biocidas de otras especies de agave como el *Agave americana;* en donde Fuertes, et al. (2010), reportaron el efecto del extracto liofilizado evaluado a las 24 horas de aplicación, obteniendo 78% de mortandad sobre *Aphis gossypii* “pulgón [19]. Lo anterior concuerda con lo citado por Villavicencio, et al. (2010), donde Dharmashaktu., *et al*, (1987), reportaron 100% de mortandad de las larvas de mosquitos de la familia culicidae al ser aplicados con los extractos de las hojas de *Agave americana* [17].

Los extractos de *A. diapensioides* “yareta” en todas sus diluciones afectaron críticamente a la cubierta cerosa de *Planococcus citri*, solo las concentraciones del 50 y 75% del extracto de *Agave murpheyi* ocasionaron el mismo efecto. La remoción de la capa cerosa vuelve susceptible a dicha plaga a ser afectado por otros productos. Esto

resultados son corroborados por Villar (2015), donde realizó la aplicación del detergente agrícola TS-2035 como coadyuvante frente a hembras adultas de *Pseudococcus viburni,* en donde obtuvo que las aplicaciones de clorpirifós y hongos entomopatógenos fueron significativamente menor a los mismos tratamientos mas la adición del detergente. La aplicación del detergente removió la capa cerosa de dichos insectos y los dejó susceptibles frente a la aplicación de productos entomopatógenos y químicos[39].

La concentración al 50% del extracto de A. diapensioides "yareta" presentó mayor eficiencia sobre la concentración al 60%, esto debido que el extracto de yareta fue mucilaginoso y a mayor concentración fue más difícil de diluir, por lo cual no se dispersaba de manera homogénea y no abarcó el 100% de los individuos de *Planococcus citri.*

Los controles (positivo y negativo) tuvieron una rápida evaporación al cabo de las primeras 5 horas, diferente al extracto de *A. diapensioides* "yareta" el cual todas las diluciones permanecieron con un mucilago en los brotes de papa hasta las 24 horas después de la última evaluación, demostrando la durabilidad del producto. Los extractos de agave solo perduraron los de las concentraciones más altas.

Los porcentajes de mortandad de las diluciones de los extractos de *Azorella diapensioides* "yareta" evaluados a las 24 horas postaplicación fueron de T2(10%)=39.4; T3(25%)=44.1; T4(50%)=61.8; T5(60%)=60.7 y los extractos de *Agave murpheyi* "agave" evaluados a las 24 horas postaplicación fueron de T2(10%)=18.3; T3(25%)=31.3; T4(50%)=48.8; T5(60%)=65.5. Siendo catalogados como eficientes los extractos con efectividad superior al 60% y con 72 horas como tiempo aceptable de exposición de una plaga a medios biológicos, establecido por el Manual de Funciones de Protección de Plantas: Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV, 2008), citado por Sobrino, et al (2016). Estos mismos autores reportan el efecto insecticida del 12.5, 25, 50 y 100% del extracto

por compresión de las hojas de *Furcraea hexapétala* sobre la plaga *Plutella xylostella* “polilla de la col” obteniendo como resultados una mortandad de 0, 42, 50, 59% evaluados a las 24 horas y 27, 65, 75, y 78% de mortandad evaluados a las 72 horas respectivamente [40]. Lo anterior concuerda con Guevara, *et al.* (2015), que reportaron el efecto bioinsecticida del extracto etanólico por maceración y destilación de dos plantas frente a *Bemisia tabaci* “mosca blanca”. Los extractos en diluciones de 5, 10 y 15% de hojas de *Lantana cámara* y *Ricinus communis* obtuvieron como resultado 9.9; 11.6; 8.5 y 11.6; 16.6; 28.9% de mortandad respectivamente evaluado a las 24 horas de aplicación y 26.6; 35.1; 39.8 y 49.6; 36.5; 52.4% de mortandad respectivamente evaluado a las 72 horas de aplicación [41].

El screening fitoquímico del extracto etanólico de *Azorella diapensioides* demostró poseer los grupos de metabolitos como terpenos y flavonoides, siendo estos los compuestos secundarios a los cuales se les atribuye el efecto insecticida y antialimentario; concordando con el estudio de Kim, et al. (2003), donde los extractos metanólicos de diferentes plantas aromáticas con una gran cantidad de terpenos, probaron tener actividad insecticida frente a *Sytophilus oryzae* gorgojo del tabaco y *Callosobruchus chinensis* gusano de la lenteja [42]. También concuerda con Morimoto, et al (2003), donde se evaluaron 4 extractos de flavonoides frente a las larvas de *Spodoptera litura* y se obtuvo como resultado un efecto antialimentario moderado [43].

El efecto insecticida mayor al 50% obtenido de los extractos etanólicos de *Agave murpheyi* es debido a la presencia en grandes cantidades de fenoles, taninos, saponinas y en menor cantidad los terpenos en el screening fitoquímico realizado a dicho extracto. Dichos resultados se pueden comparar con el estudio de Iannacone, et al. (2013), en donde el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *Agave americana* presentó taninos, flavonoides, saponinas y glicósidos; la aplicación de los

extractos de dicha planta frente a *Melanoides tuberculata* obtuvieron grandes efectos controladores[12].

VI. CONCLUSIONES

- Los mejores resultados del efecto insecticida de los extractos etanólicos fueron los de *Agave murpheyi* al 75% con una mortandad de

Planococcus citri “chanchito blanco” de 65% y de *Azorella diapensioides* al 50% con una mortandad corregida al 61%.

- Los porcentajes de mortandad de los extractos de *A. diapensioides* “yareta” en sus diferentes concentraciones variaron desde 40 - 60% a las 24 horas de aplicación, obteniendo así desde una moderada a una gran mortandad de dicha plaga, pero solo las concentraciones al 50 y 60% estuvieron por encima del 60% de eficiencia.
- Los porcentajes de mortandad del extracto de *Agave murpheyi* forma variegata en sus diferentes concentraciones variaron desde 18 - 65% a las 24 horas de aplicación, obteniendo así una baja, media y alta mortandad; solo la concentración al 75% estuvo por encima del 60% de eficiencia.
- Ambos extractos demostraron tener efecto insecticida en tiempos muy cortos de evaluación (5 y 24 horas). Pudiendo obtener resultados más favorables con tiempos prologados de exposición.
- Ambos extractos demostraron poseer diferentes grupos de compuestos secundarios como fenoles, terpenos, flavonoides y saponinas que les confiere el efecto insecticida sobre dicha plaga.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio más profundo sobre los grupos de compuestos secundarios encontrados en dichos extractos, para así determinar cuál o cuáles de ellos les confiere dicho efecto.
- Continuar con la línea de investigaciones de productos biocidas (orgánicos) que lleven a el control de *Planococcus citri*, siempre y cuando sean viables para los agricultores y amigable con el medio ambiente.
- Realizar evaluaciones de los productos a base de extractos de *Azorella diapensioides* y *Agave murpheyi* en diversas concentraciones y en tiempos más prolongados de exposición.
- Realizar el ajuste de los resultados sobre la mortandad de individuos ya que mucho de ellos son susceptibles a la manipulación y se puede obtener falsos resultados.
- Para los ensayos *in vitro* con brotes de papa, es recomendable tubérculos con poca cantidad de brotes para evitar la pérdida de individuos entre los brotes.
- Realizar estudios a nivel de invernadero y de campo para evidenciar el efecto de dichos extractos frente a la plaga y a las condiciones ambientales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) **MARTÍNEZ M.** Biología y control del cotonet *Planococcus citri* (Homoptera: Pseudococcidae) en huertos de cítricos. Tesis Doctoral. Valencia-España: Universidad Politécnica de Valencia; 2003.

2) **ASIEDU E., KOFI J., KWOSEH C.** Biology of *Planococcus citri* (Risso) (Hemíptera: Pseudococcidae) on five Yam Varieties in Storage. *University of Science and Technology*. 2014; 2(4): 167-175.

3) **RIPA R., LARRAL P., LUPPICHINI P., GUAJARDO V., ROJAS S.** Manejo de Plagas de Paltos y Cítricos: Chanchito blanco de los Cítricos o Cochinilla algodonosa. *Instituto de investigaciones Agropecuarias*. 2008; 23: 180-205.

4) **HARSIMRAN K., GAURAV G., GILLETT J.** Citrus Mealybug *Planococcus citri* (Risso) (Insecta: Hemiptera: Pseudococcidae). *Document EENY537*. 2012; 1: 1-4 p.

5) **ALTIERI M., NICHOLLS, C.** Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. *Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe.* 2000; 1: 7-21.

6) **NAVA E., GARCÍA C., CAMACHO J., VÁZQUEZ E.** Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*. 2012; 8(3): 17-29.

7) **VERA H., VERA C., BELLO I., TIPÁN J., MENDOZA G., AVELLAN M.** Bioensayos para potenciar extractos vegetales y controlar insectos-plagas del tomate (*Licopersicum esculentum* Mill). Manta-Ecuador: *Avances en Investigación Agropecuaria*. 2016, 20(3): 17-32.

8) **AMARILES S., GARCÍA C., PARRA G**. Actividad insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Aedes aegypti*, Diptera: Culicidae. *Rev CES Med*. 2013; 27 (2): 193-203.

9) **GARCÍA V., SOTO A., BACCA V.** Efecto insecticida de productos alternativos en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 2014; 40 (2): 143-147.

10) **GARCIA A.** Los agaves de México: *Agave americana* "Marginata". Revista Científica de América Latina y el Caribe. 2007; 14-23.

11) **GILMAN E.** *Agave americana* 'Marginata' Variegated Century Plant. Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS). Estados Unidos: *Universidad de Florida*. 1999; 2 p.

12) **IANNACONE J., LA TORRE M., ALVARIÑO L., CEPEDA C., AYALA H., ARGOTA G.** Toxicity of the biopesticides *Agave americana*, *Furcraea andina* (asparagaceae) and *Sapindus saponaria* (sapindaceae) on invader snail *Melanoides tuberculate* (thiaridae). *Neotropical Helminthology.* 2013; 7(2): 231 – 241.

13) **LUCENA I., NOVARA L., CUEZZO A.** Aportes Botánicos de Salta. Flora del Valle de Lerma: Apiaceae Lindl. Buenos Aires-Argentina: Universidad Nacional de Salta. 2001; 6(1): 05 –12.

14) **MUÑOZ M., SERRA T.** Ficha de Antecedentes de Especie; Estado de Conservación de las Plantas de Chile: Descripción y antecedentes de Azorella compacta Phil. 2006; 01 - 06 p.

15) **TELLO V., CHUNG S., VARGAS R.** Estudio preliminar del efecto acaricida de seis extractos metanólicos sobre la arañita bimaculada, *Tetranychus urticae* Koch. Iquique-Chile: Universidad Arturo Prat. 2014; 32 (2): 37-45.

16) **ARECHE C., ROJAS F., SEPÚLVEDA V., CAMPOS C., LIMA C., PÉREZ E.** Further mulinane diterpenoids from *Azorella compacta. Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013; 1231–1238.

17) **VILLAVICENCIO N., PÉRE B., GORDILLO A.** Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de hidalgo.

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe. 2010; 30 (1) 193-238.

18) **NEIRA M., VELASTEGUÍ R.** Estudio fitofarmacológico del manejo del "Oídio" (*Oidium sp*.)", "Trips" (*Frankliniella occidentalis*) y "Pulgones" (*Myzus sp.),* en rosas de exportación con la utilización de extractos vegetales. Tesis. Ambato-Ecuador: Universidad Técnica de Ambato. Nevado. 2010; 1-20.

19) **FUERTES C., JURADO B., GORDILLO G., NEGRÓN L., NÚÑEZ E., ESTEBAN M., *et al*.** Estudio integral de plantas biocidas del algodonero. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010; 13(1): 34-41.

20) **LOYOLA L., BORQUEZ J., MORALES G., SAN-MARTIN A., DARIAS J., FLORES N., *et al.*** Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *ScienceDirec.* 2004; 65(13): 1931–1935.

21) **SANTIAGO N., CARRILLO J., JEREZ M., CHÁVEZ J., PERALES C.** Extractos vegetales para el control de mosquita blanca *Bemisia tabaco gen* en tomate. *Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible.* 2009; 7.

22) **RUIZ J.** Actividad antifúngica *In Vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. Tesis Magistral. Lima-Perú: *UNASAM*. 2003.

23) **LIZCANO J., VERGARA J.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y/o aceites esenciales especies vegetales frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis. Bogotá-Colombia: *Pontífice Universidad Javeriana.* 2008.

24) **CABELLO N., BELLOSO M.** Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos

acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum L*. *Revista UDO Agrícola*. 2009; 9 (3): 705-710.

25) **AÑAMURO C.** Determinación del efecto biocida del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* sweet (tarwi) sobre *Thrips tabaci* lindeman (trips) en cultivos de cebolla. Tesis de Post Grado. Arequipa-Perú: Universidad Católica de Santa María. 2016.

26) **FUENTES O., CERNA E., LANDEROS J., HERNÁNDEZ S., DELGADO J.** Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp*. *Revista Internacional de Botánica Experimental.* 2012; 81: 69-73.

27) **LOCK O.** Investigación Fitoquímica. Método en el estudio de Productos Naturales. Lima-Perú. Centro Editorial PUCP. 2017; 2.

28) **ALAYO N., GUEVARA L.** Identificación Preliminar de Fitoconstituyentes en las Inflorescencias de *Bejaria aestuans* L. (purum - rosa). Tesis de Farmacia y Bioquímica. Trujillo-Perú: Universidad Nacional de Trujillo. 2012.

29) **ERAZO E.** Separación y Caracterización de los Metabolitos Secundarios de la Hiedra (*Hedera helix*) de Ecuador con Fines de Aporte a una Técnica de Identificación. Tesis de Bioquímica Farmacéutica. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2013.

30) **CARVAJAL L., HATA Y., SIERRA N., RUEDA M.** Análisis Fitoquímico Preliminar de Hojas, Tallos y Semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombia Forestal*. 2019; 12: 161-170.

31) **QUIRÓS L.** Comportamiento Estacional de Chanchito blanco (Hemiptera: Pseudococcidae) y de sus Parasitides en Palto (*Persea*

americana mill). Tesis de Grado. Quillota-Chile: Universidad Católica de Valparaíso. 1998.

32) OYARZÚN S. Taxonomía y Observaciones Biológicas del Chanchito blanco de los Frutales, *Pseudococcus viburni* (Signoret). (Hemiptera: Pseudococcidae). Tesis de Grado. Santiago-Chile: Universidad de Chile. 2004.

33) GARCIA M. Establecimiento de un Pie de Cría Comercial de *Leptomastidea abnormis* Girault (Hymenoptera: Eucyrtidae). Tesis de Grado para Agronomía. Quillota-Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 2007.

34) ALARCÓN R., PENIERES G. Evaluación *in vitro* de extractos de hojas y flores de llama del bosque (*Spathodea campanulata B.*) sobre la broca del café (*Hypothenemus hampei F.*). *Tecnología en Marcha.* 2012; 26(3): 39 – 48.

35) KARAMAOUNA F., KIMBARIS A., MICHAELAKIS A., PAPACHRISTOS D., POLISSIOU M., PAPATSAKONA P., *et al.* Insecticidal Activity of Plant Essential Oils Against the Vine Mealybug, *Planococcus ficus*. *Journal of Insect Science*. 2013; 13(142): 1-12.

36) ENRIQUE L., JIMÉNEZ J., DELGADO D. Actividad biológica in vitro del extracto de *Capsicum chínense* Jacq contra Bemisia tabaci Genn. Revista Chapingo serie horticultura. 2012; 18(3): 345-356.

37) HENNING C., RINGUELET J., URRUTIA M., YORDAZ R. Actividad insecticida y repelente de aceites esenciales de laurel y lemongrass sobre *Bemisia tabaci.* Boletín de sanidad vegetal Plagas. 2012; 38(2): 356 – 360.

38) BORKOSKY S., SOSA A., VERA N. Productos naturales de Azorella compacta: Evaluación de su potencial insecticida y molusquicida. Argentina. 2016.

39) VILLAR M. Efecto del detergente agrícola ts-2035 usado como coadyuvante de dos hongos entomopatógenos y un insecticida convencional, asperjados sobre hembras adultas de chanchito blanco de la vid (Pseudococcus viburni signoret) (hemiptera: pseudococcidae) en laboratorio. Tesis. Santiago-Chile: Universidad de Chile; 2015.

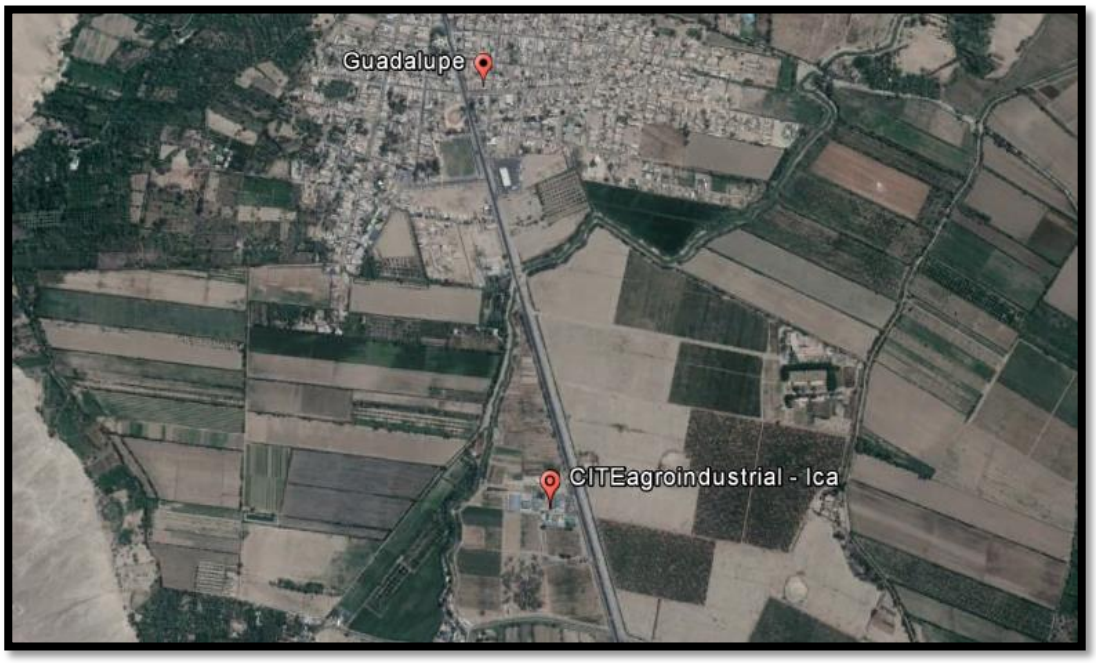
40) SOBRINO J., FERNANDEZ A., ORTEGA I., CASTELLANOS L. Efecto insecticida del extracto de *Furcraea hexapetala* (Jacq.) Urban sobre *Plutella xylostella* L. Cienfuegos-Cuba. Centro Agrícola. 2016; 43 (1): 85-90.

41) GUEVARA L., ANDRIO E., CERVANTES F., RODEIGUEZ D., ROBLES R., MONDRAGON W., PEREZD. Efecto bioinsecticida de extracto etanólico de higuerilla (*Ricinius communis* L) y lantana (*Lantana camara* L) sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn) en tomate. Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2015; 2(3). 3428-434.

42) KIM S., ROH J., KIM D., LEE H., AH H. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis. Journal of Stored Products Research.* 2003; *39. 293–303.*

43) MORIMOTO M., TANIMOTO K., NAKANO S., OZAKI T., NAKANO A., KOMAI Y. Insect Antifeedant Activity of Flavones and Chromones against *Spodoptera litura*. J. *Agric. Food Chem*. 2003; 51(2): 389-393.

ANEXOS



Anexo N°1.

Fig. 01. Ubicación geográfica del Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica CITEagroindustrial, coordenadas: 13°59'50.96"S y 75°46'11.68"O.

Fig. 02. Ubicación geográfica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica y la Facultad de Farmacia y Bioquímica, coordenadas:

14° 5'6.46"S y 75°44'3.69"O.

Fig. 03. Ubicación geográfica del departamento de Ica, toma de muestra de *Agave murpheyi* “agave”, coordenadas: 14°40'0.73"S y 74°26'57.78"O.

Fig. 04. Ubicación geográfica de la Reserva Nacional Pampa Galeras-Bárbara d'Achille, toma de muestra de la planta *Azorella diapensioides* “yareta”, coordenadas: 14° 4'34.62"S y 75°44'3.16"O.

Anexo N°2.

Identificación de *Agave murpheyi* “agave” (Anexo 2A)

Identificación de *Azorella diapensioides* “yareta” (Anexo 2B)

Anexo N°3.

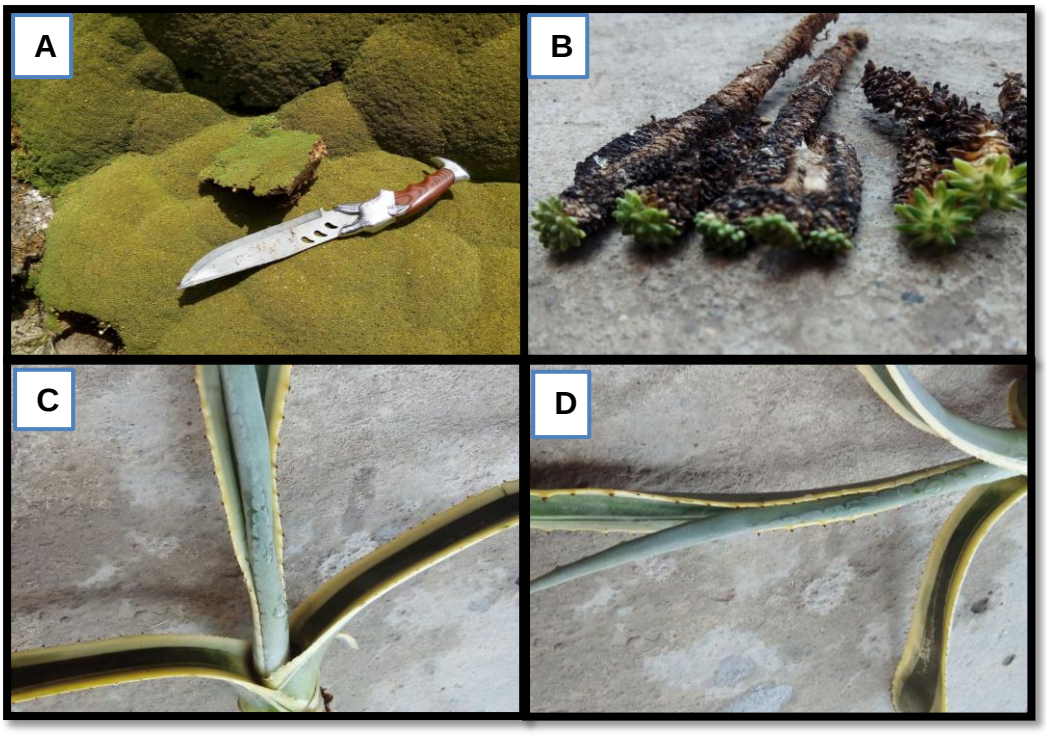
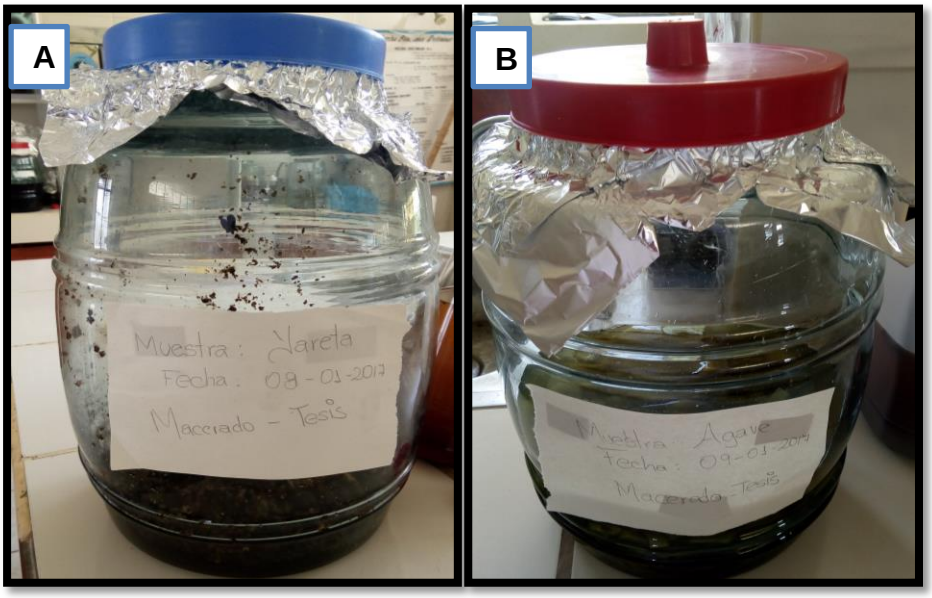


Fig. 05. Plantas colectadas para la identificación. **A y B.-** Muestra de *Azorella diapensioides* "yareta" colectada. **C** y **D.-** Muestras de *Agave*



murpheyi "agave" colectada para identificación.

Fig. 06. A.- Maceración por 48 horas de muestras fragmentadas de *Azorella diapensioides* "yareta". **B.-** Maceración por 48 horas de muestras picadas de *Agave murpheyi* "agave".

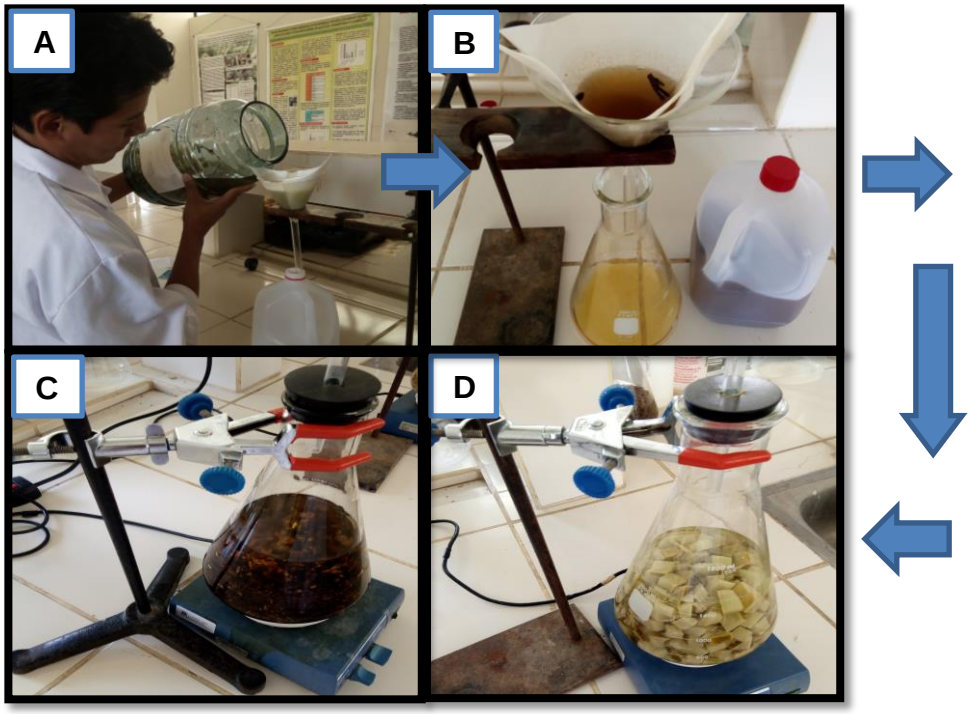


Fig. 07. A y **B.-** Colado del macerado después de 48 horas. **C** y **D.-** Reflujo en matraces de *Azorella diapensioides* “yareta” y *Agave murpheyi*

“agave” durante 8 horas.

Fig. 08. Rotaevaporador: Concentrado de los extractos etanólicos obtenidos mediante reflujo.

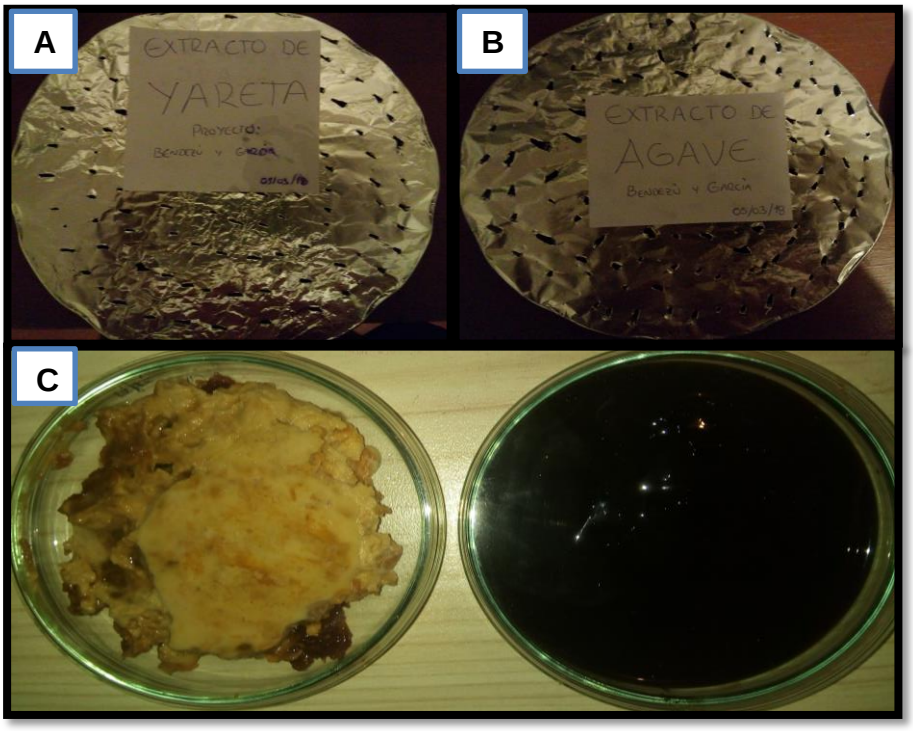


Fig. 09. A y B.- Extractos concentrados puestos a ventilación para extraer el alcohol residual. **C.-** Extractos secos en placas Petri, listo para aplicación.

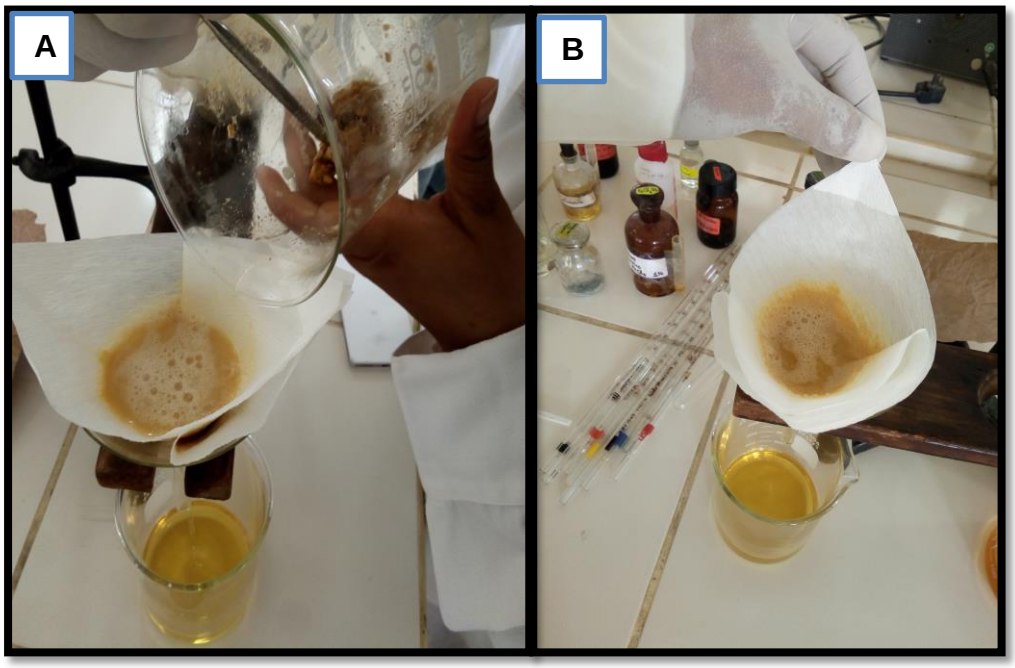


Fig. 10. A y B.- Extracto más ácido clorhídrico para la obtención de la fracción "B". Colado para extraer parte del extracto crudo.

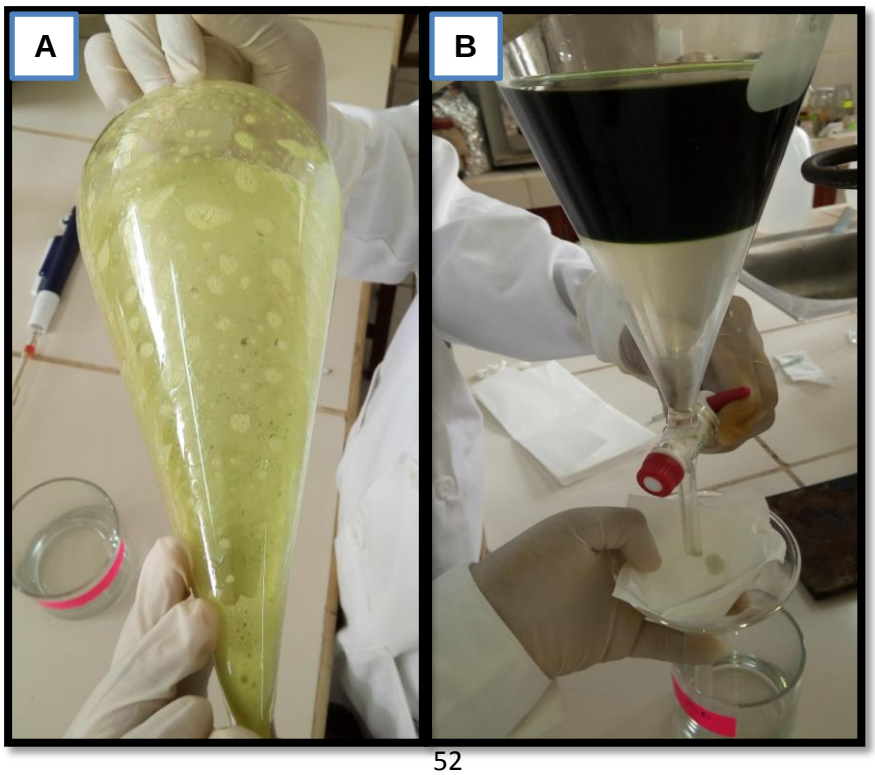


Fig. 11. A y B.- Extracto, ácido clorhídrico y diclorometano, obtención de las fracciones C, D y E.

Fig. 12. Reacción de Shinoda: Muestras de fracción E, un control y otra con limaduras de magnesio más gotas de ácido clorhídrico.

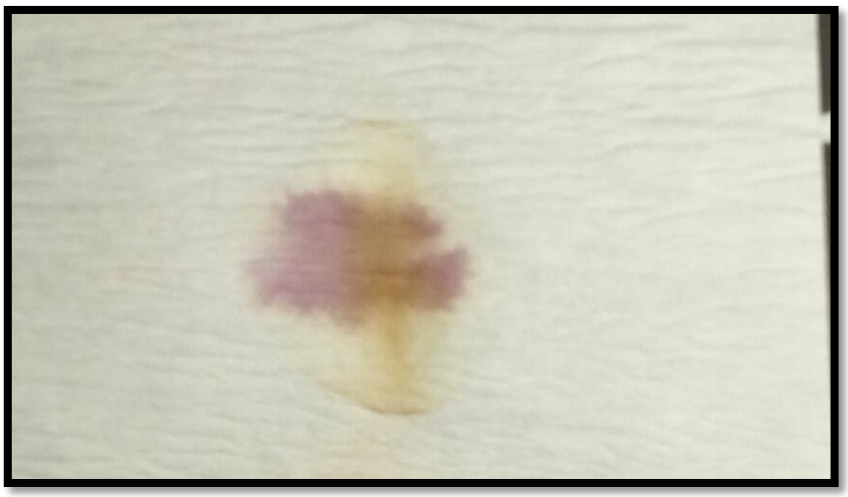


Fig. 13. Reacción de Ninhidrina: Determinación de Aminoácidos en Fracción A. Coloración violeta, presencia de aminoácidos.

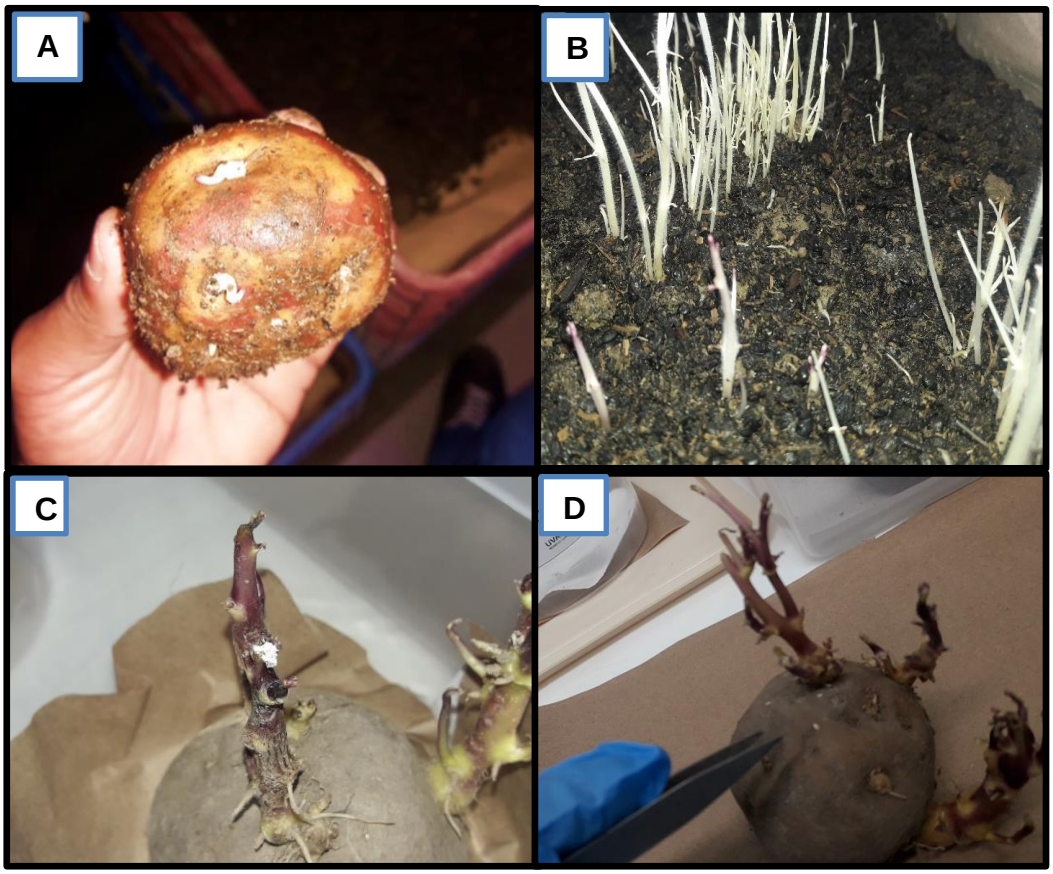


Fig. 14. A.- Semilla de *Solanum tuberosum "papa"* germinada después de la siembra. **B.-** Brotes etiolados de papa a los 15 días de siembra. **C** y **D.-** tubérculos de papas cosechados para puesta de chanchito blanco.

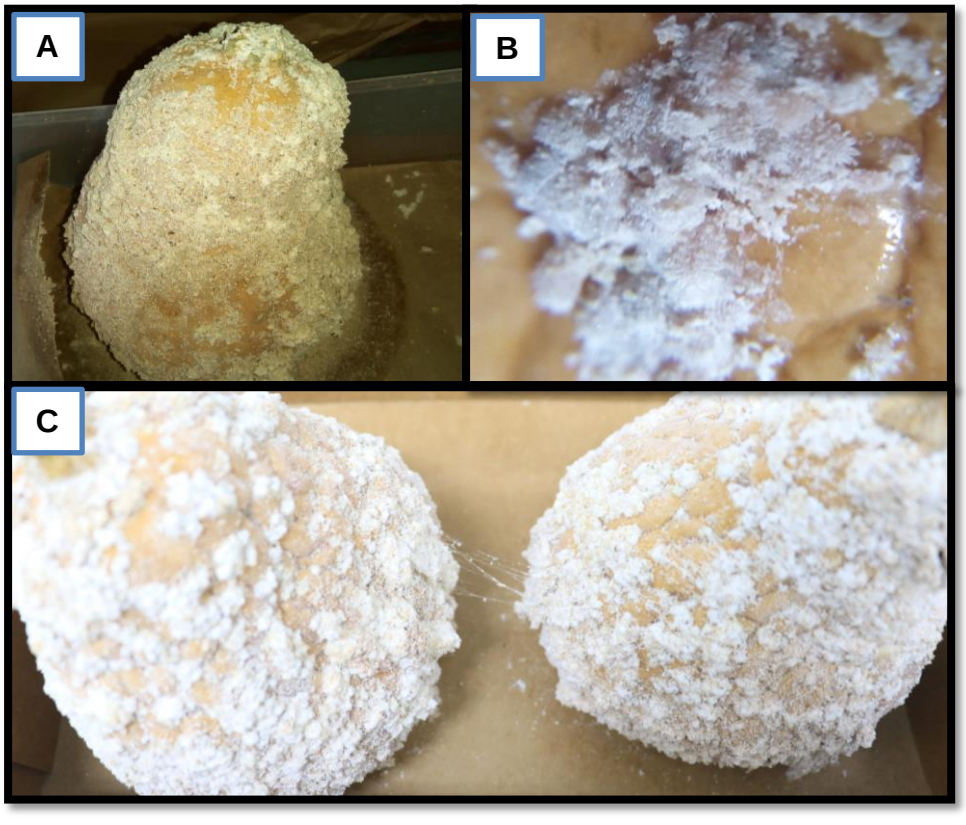


Fig. 15. Producción de *Planococcus citri* “chanchito blanco” en zapallo. Producción a gran escala en laboratorio para los ensayos de mortandad.

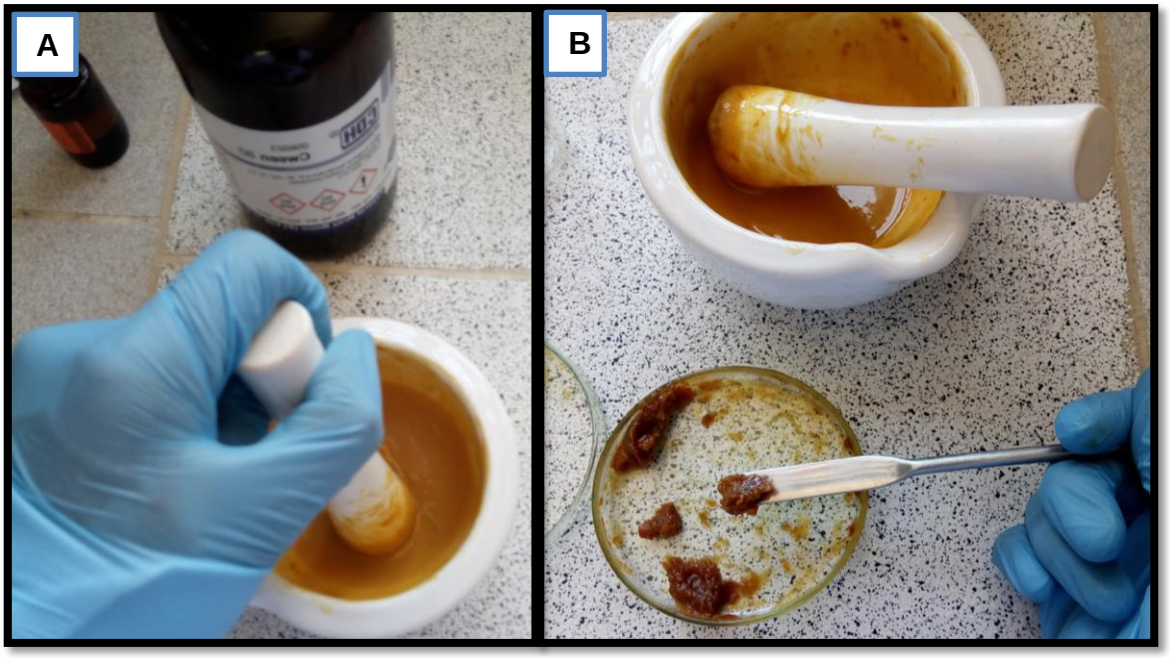


Fig. 16. Dilución madre del extracto etanólico de *Azorella diapensioides “yareta”* con tween 80.

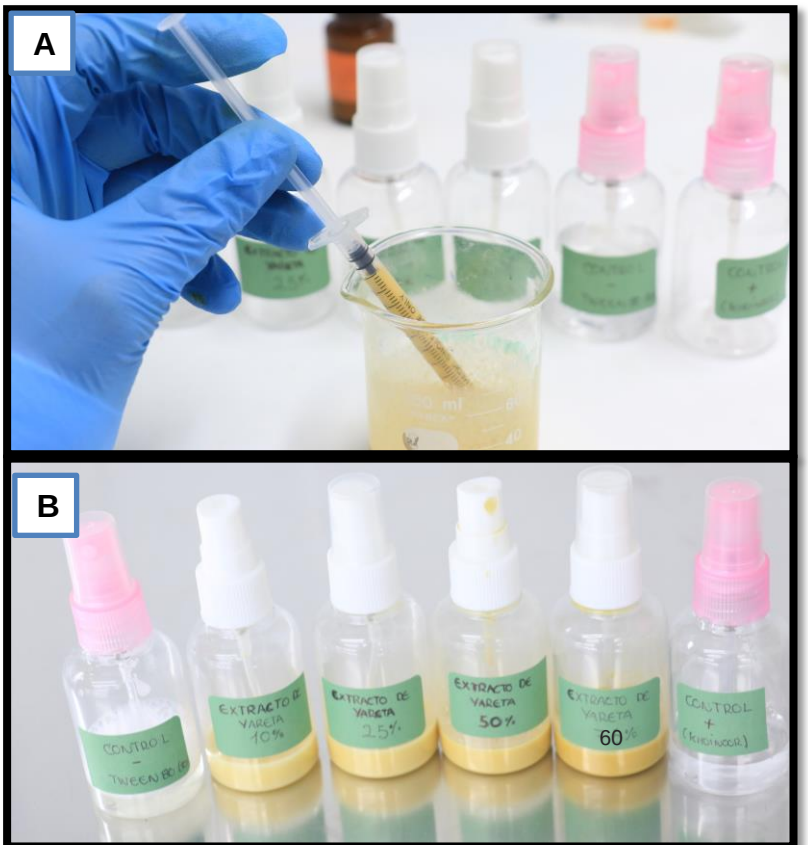


Fig. 17. Dosificación de las diluciones del extracto de *Azorella diapensioides "yareta"* colectada en 10,25, 50 y 60%.

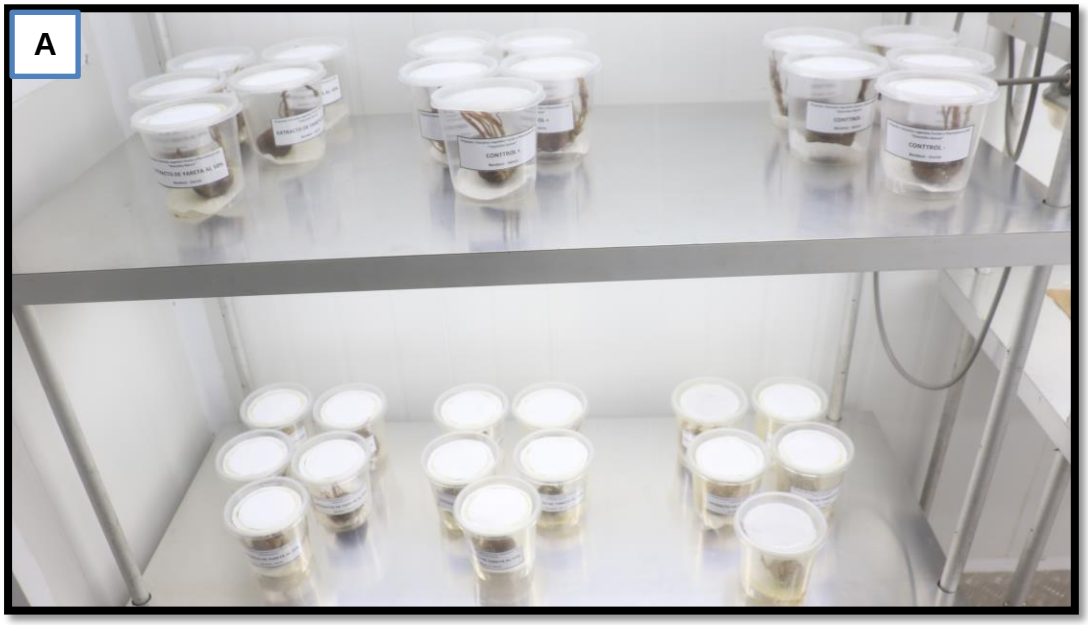


Fig. 18. A.- Cámara climática con condiciones controladas. Temperatura 24°C, humedad relativa 65% y luminosidad 12 horas luz.

Fig. 18. B.- Brotes de *Solanum tuberosum "papa"* en donde se colocaron entre 10 a 40 individuos de chanchito blanco para ser aplicados con los extractos.

Fig. 18. C.- Tubérculos de *Solanum tuberosum "papa"* en frascos de 1 litros para ser aplicados con las diluciones del extracto de *Azorella diapensioides* "yareta".

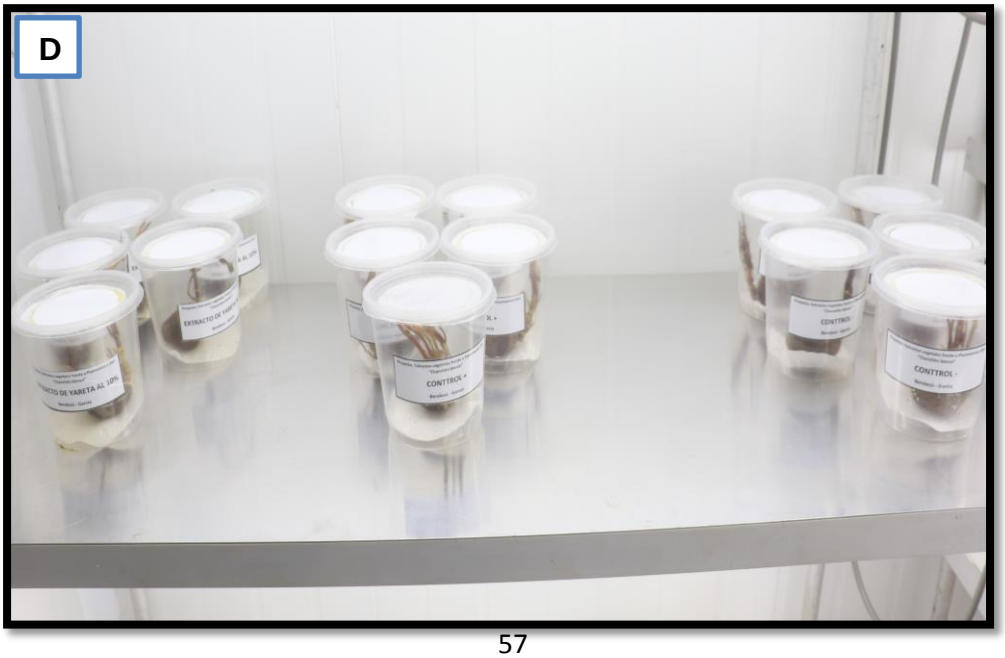


Fig. 18. D.- Repeticiones de tubérculos de *Solanum tuberosum "papa"* en frascos de un litro para las diferentes diluciones de los extractos.

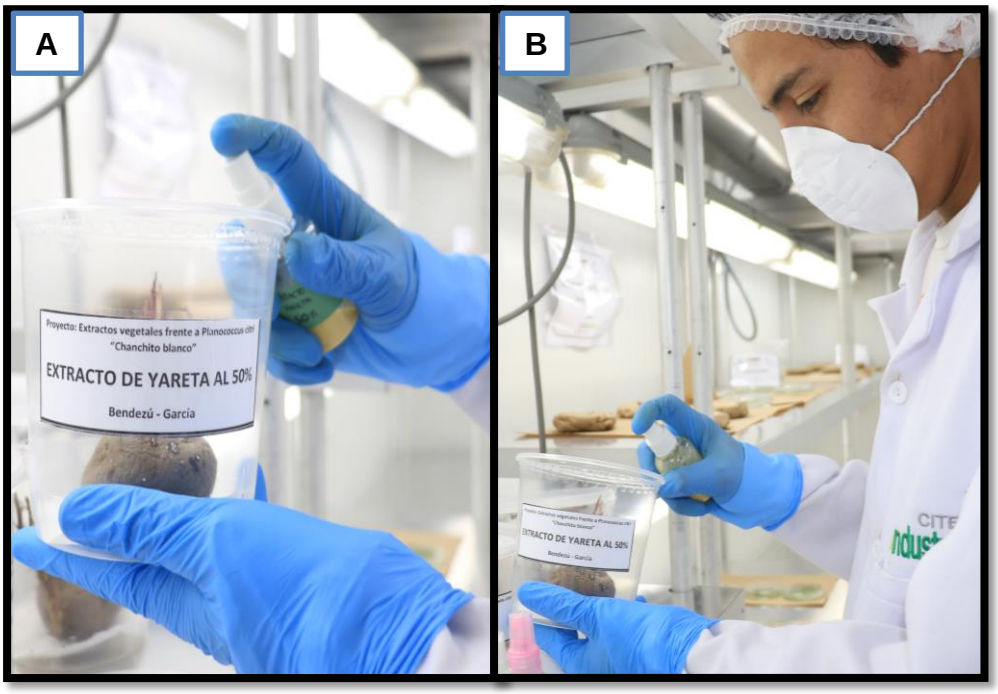


Fig. 19. A y B.- Aplicación de los diferentes extractos sobre los individuos de *Planococcus citri* "chanchito blanco" puestos en los brotes de *Solanum tuberosum* "papa".

Fig. 19. C.- Tubérculos de *Solanum tuberosum* “papa*”* con los individuos de chanchito blanco aplicados con los extractos.

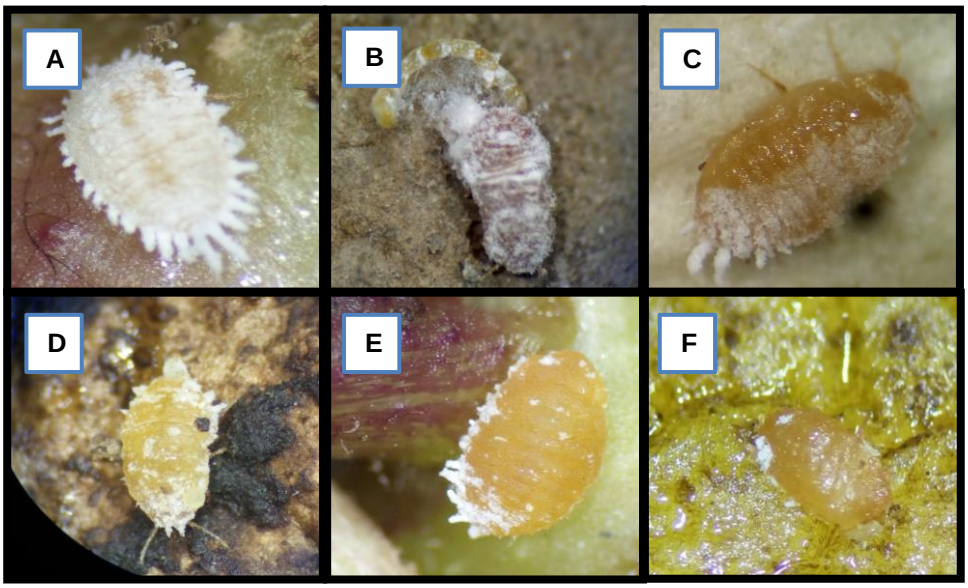


Fig. 20. Características morfológicas de *Planococcus citri* “chanchito blanco” después de ser aplicados con el extracto de *Azorella diapensioides* “yareta”: **A.**-Control negativo. **B.**-Control positivo **C.-** Control al 10%. **D.-** Control al 25% **E.-** Control 50%. **F.-** Control 60%.

Fig. 21. Presencia de secreciones en los individuos de *Planococcus citri* “chanchito blanco” como reacción a las aplicaciones de los extractos de *Azorella diapensioides* “yareta”.

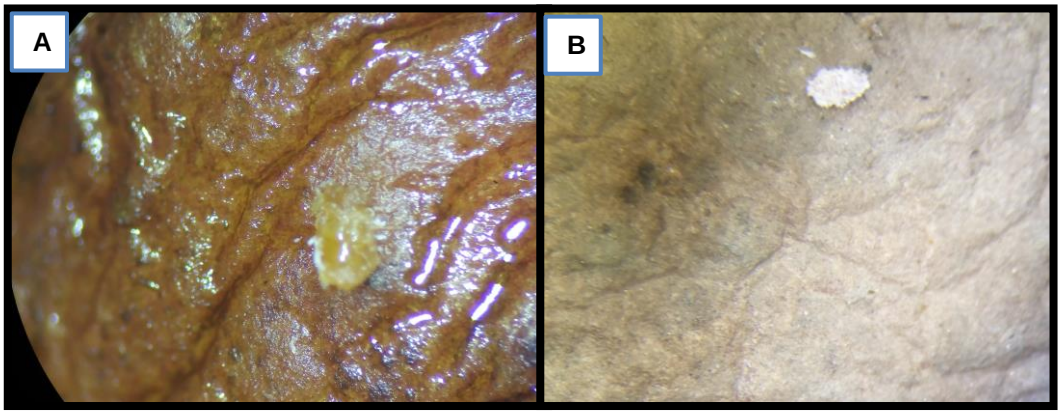


Fig. 22. A.- Tubérculos de *Solanum tuberosum* “papa*”* con presencia de residuos del extracto de yareta después de 24 horas de aplicados. **B.-** Tubérculos de *Solanum tuberosum* “papa*”* sin presencia de residuos, evaporación a las 5 horas después de las aplicaciones del control negativo.

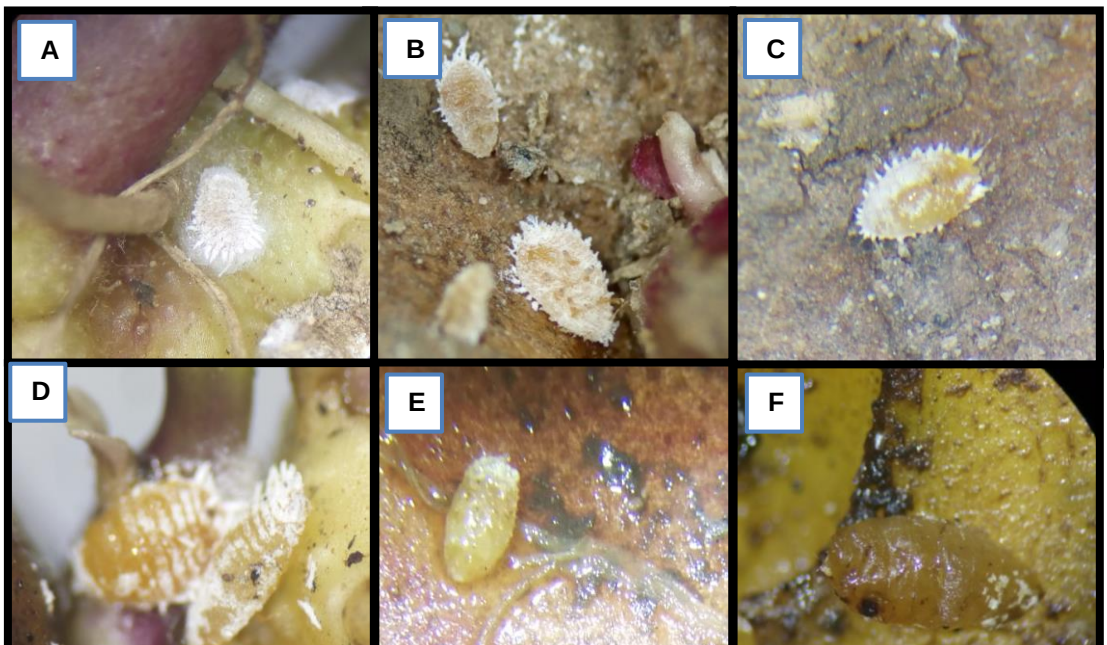


Fig. 20. Características morfológicas del *Planococcus citri* “chanchito blanco” después de ser aplicados con el extracto de *Agave murpheyi* “agave”: **A.**-Control negativo. **B.**-Control positivo **C.-** Control al 10%. **D.-** Control al 25% **E.-** Control 50%. **F.-** Control 60%.